

**Neue Paullone als Wirkstoffe
gegen Leishmanien und Trypanosomen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Jasmin Ryczak
aus Kassel

1. Referent:	Professor Dr. Conrad Kunick
2. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
eingereicht am:	23.05.2012
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.07.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Ryczak, J., Kunick, C.: Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen. Antimon und mehr. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 538-544.

Tagungsbeiträge

Ryczak, J., Preu, L., Papini, M., Jaffe, C. L., Kunick, C.: Cinnamamide paullone hybrids as potential antileishmanial agents. (Poster) *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Stockholm, Schweden (2011).

Ryczak, J., Preu, L., Papini, M., Jaffe, C. L., Kunick, C.: Synthesis and in vitro antiprotozoal activities of novel cinnamamide paullone hybrids. (Poster) *Gemeinsame ÖPhG-DPhG-Jahrestagung*, Innsbruck, Österreich (2011).

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2008 bis Mai 2012 am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von

Herrn Professor Dr. Conrad Kunick,

dem ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und Unterstützung sowie die schöne Zeit im Arbeitskreis danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt auch

Herrn Professor Dr. Ingo Ott

für die Übernahme des Koreferats.

Meiner Mama Hannelore und meinem Papa Karl gewidmet

1

3.1.3	Synthese von (2 <i>E</i>)-3-(9- <i>tert</i> -Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-2-yl)acrylsäuremethylester (38).....	35
3.1.4	Synthese der Acrylamide 40a-o	35
3.2	Synthese von <i>N</i> -{4-[(1 <i>E</i>)-3-Oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]phenyl}-benzamid (44) als Modellschubstanz für die selektive Reduktion der C,C-Doppelbindung der Chalkon-Teilstruktur	38
3.3	Synthese von {4-[(2 <i>E</i>)-3-(9- <i>tert</i> -Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-2-yl)prop-2-enoyl]phenoxy}essigsäure (20)	40
3.4	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (21)	41
3.4.1	Weitere Versuche zur Darstellung von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (21)	43
3.4.2	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (47)	44
3.4.3	Versuch zur Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (21)	44
3.5	Synthese der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride 24a-k und 25a-e	45
3.6	Synthesesequenz für die Darstellung von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-[(2 <i>E</i>)-3-phenylprop-2-enoyl]-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (26)	48
3.6.1	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-vinyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (48)	49
3.6.2	Versuche zur Darstellung von 2-Acetyl-9- <i>tert</i> -butyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (49)	50
3.6.3	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-[(trimethylsilyl)ethinyl]-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (51)	52
3.6.4	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-ethinyl-7,12-dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (52)	53

3.6.5	Synthese von 2-Acetyl-9- <i>tert</i> -butyl-7,12-dihydroindolo- [3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (49)	54
3.6.6	Synthese von 9- <i>tert</i> -Butyl-2-[(2 <i>E</i>)-3-phenylprop-2-enoyl]-7,12- dihydroindolo[3,2- <i>d</i>][1]benzazepin-6(5 <i>H</i>)-on (26)	55
4.	Biologische Aktivität	57
4.1	Affinitätschromatographische Untersuchungen zur Identifizierung von biologischen Zielstrukturen der Paullon-Chalkon-Hybride	57
4.2	AlamarBlue®-Assay: Bestimmung der antiprotozoalen Aktivität und der Toxizität	59
4.3	Antileishmanielle Aktivität	61
4.4	Antitrypanosomale Aktivität	66
4.5	Physikochemische Eigenschaften	71
5.	Zusammenfassung	76
6.	Summary	78
7.	Experimenteller Teil	80
7.1	Allgemeines	80
7.1.1	Geräte und Methoden	80
7.1.2	Ausgangsmaterialien	83
7.2	Synthesen und analytische Daten	84
7.3	Biologische Daten	133
7.3.1	Zellkulturen	133
7.3.2	Bestimmung der Wachstumshemmung von axenischen Amastigoten	133
7.3.3	Bestimmung der Wachstumshemmung von Trypomastigoten (Blutform)	134
7.3.4	Bestimmung der GI ₅₀ -Werte	134
7.3.5	Assay zur Bestimmung der Toxizität gegenüber humanen Zellen (THP-1-Zellen)	134

7.3.6	Identifizierung leishmanieller Proteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie.....	135
8.	Literaturverzeichnis	136

Abkürzungsverzeichnis

ACN: Acetonitril; AcOH: Essigsäure; aliph.: aliphatisch; AAV: Allgemeine Arbeitsvorschrift; Ar: Aryl; AxA: axenische Amastigoten; ber.: berechnet; CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*; CDK: *cyclin-dependent kinase*; CRK 1: *Cdc2-related-protein kinase 1*; CRK 3: *Cdc2-related-protein kinase 3*; d: Dublett; DAD: *diode array detector*; DC: Dünnschichtchromatographie; dd: Dublett vom Dublett; δ : chemische Verschiebung; DEPT: *distorsionless enhancement by polarisation transfer*; DFMO: Difluormethylornithin; DMF: *N,N*-Dimethylformamid; DMSO: Dimethylsulfoxid; DMSO- d_6 : Hexadeuterodimethylsulfoxid; DNDI: *Drugs for Neglected Diseases Initiative*; dt: Dublett vom Triplett; D₂O: Deuteriumoxid; EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; EI: Elektronenstoß-Ionisation; Et₃N: Triethylamin; EtOH: Ethanol; GI₅₀: *growth inhibition 50%*; GSK: Glykogen-Synthase-Kinase; Hg(OAc)₂: Quecksilber(II)acetat; HPLC: *high performance liquid chromatography*; HRMS: *high resolution mass spectrometry*; Hz: Hertz; Inhib.: Inhibition; IR: Infrarotspektroskopie; J: Kopplungskonstante; KH: Kaliumhydrid; konz.: konzentriert; L: *Leishmania*; λ_{max} : Wellenlänge des Absorptionsmaximums; $\lambda_{\text{em/ex}}$: Emissions-/Anregungswellenlänge; M: molar; m: Multiplett; [M]⁺: Molekülradikalkation; miLogP: mit Molinspiration kalkulierter LogP-Wert; M_r: relative Molmasse; mRNA: *messenger ribonucleic acid*; MS: Massenspektroskopie; m/z: Masse pro Ladungseinheit; N: Normalität; NaOAc: Natriumacetat; NECT: Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie; NMR: *nuclear magnetic resonance*; NT: nicht getestet; ODC: Ornithindecaboxylase; Ph: Phenyl; Pd(OAc)₂: Palladium(II)acetat; ppm: parts per million; q: Quartett; quart.: quartär; RT: Raumtemperatur; s: Singulett; Schmp.: Schmelzpunkt; SDS-Page: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SEM: Standardabweichung der Mittelwerte; STIB: Schweizerisches Tropeninstitut Basel; t: Triplett; *T.b.*: *Trypanosoma brucei*; TBS: TRIS buffered saline; tert.: tertiär; THP-1-Zellen: Humane monozytische Leukämie Zell-Linie; t_M: Totzeit; t_N: Nettoretentionszeit; TRIS: Trometamol; Tryp.: Trypomastigoten; UV: Ultraviolett; WHO: *World Health Organization*; Zers.: Zersetzung.

1. Einleitung

Die World Health Organization (WHO) beschreibt die sogenannten vernachlässigten Tropenkrankheiten als "...chronically endemic and epidemic-prone tropical diseases, which have a very significant negative impact on the lives of poor populations [and] remain critically neglected in the global public health agenda."¹ Weltweit sind über eine Milliarde Menschen von diesen durch Mikro- bzw. Makroparasiten ausgelösten Erkrankungen betroffen.² Primär treten die vernachlässigten Tropenkrankheiten in Asien, Afrika und Lateinamerika auf. Sie sind häufig in ärmeren und ländlichen Bevölkerungsschichten zu finden, denen es meistens an sanitären Anlagen und medizinischer Versorgung mangelt. Die Betroffenen leiden mitunter an sozialer Ausgrenzung und einer stark verminderten Lebensqualität. 17 Krankheiten werden von der WHO als vernachlässigte Tropenkrankheiten gelistet. Dazu zählen auch die Leishmaniose und die Afrikanische Schlafkrankheit, deren protozoische Erreger zur Familie der Trypanosomatidae gehören.³

Die Möglichkeiten zur medikamentösen Behandlung der Leishmaniose und der Afrikanischen Schlafkrankheit sind begrenzt. Die wenigen zugelassenen Arzneistoffe können aufgrund ihrer verschiedenen nachteiligen Eigenschaften nicht universell eingesetzt werden. Resistenzentwicklung, schwerwiegende Nebenwirkungen, krankheitsstadien- und erregerabhängige Wirksamkeit, hohe Therapiekosten, komplexe Therapieschemata und die häufig parenterale Applikation der Medikamente begründen, warum die Entwicklung neuer effizienter antiprotozoaler Wirkstoffe dringend erforderlich ist.

1.1 Durch Leishmanien verursachte Infektionen

Leishmanien sind protozoische Parasiten, deren Lebenszyklus mit einem Wirtswechsel verläuft. Morphologisch unterscheidet man zwei Leishmanien-Formen:

1. Promastigote Form (Endwirt)
2. Amastigote Form (Zwischenwirt)

Die Promastigoten werden von weibliche Sandmücken (Endwirt) der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* während einer Blutmahlzeit auf den Menschen (Zwischenwirt) übertragen. In Abhängigkeit von der Leishmanien-Spezies können auch andere Wirbeltiere, z. B. Hunde oder Nagetiere, als Erregerreservoir für die Parasiten dienen. Nach der Leishmanien-Infektion werden die begeißelten Promastigoten durch Makrophagen phagozytiert. In diesen Zellen entwickeln sie sich zu ihrer amastigoten Form mit anschließender intrazellulärer Vermehrung. Nach Zerstörung der Wirtszelle werden die unbegeißelten Amastigoten freigesetzt und können neue Makrophagen infizieren. Nimmt die Sandmücke bei einem Stich die mit Amastigoten befallenen Makrophagen auf, wandeln sich diese im Darm des Insekts in die promastigoten Stadien um, teilen sich und gelangen dann in den Stechrüssel. Beim nächsten Blutsaugakt können die Erreger wieder auf einen Zwischenwirt inokuliert werden und der Kreislauf beginnt von neuem.⁴

Sandmücken sind in tropischen und subtropischen Gebieten beheimatet. Da sie als Vektoren für die Leishmanien fungieren, treten Leishmanien-Infektionen in diesen Bereichen auf. Die Übertragung der Parasiten kann prinzipiell auch durch Bluttransfusionen, gebrauchte Spritzen und kongenital erfolgen; allerdings spielen diese Übertragungswege eine untergeordnete Rolle.

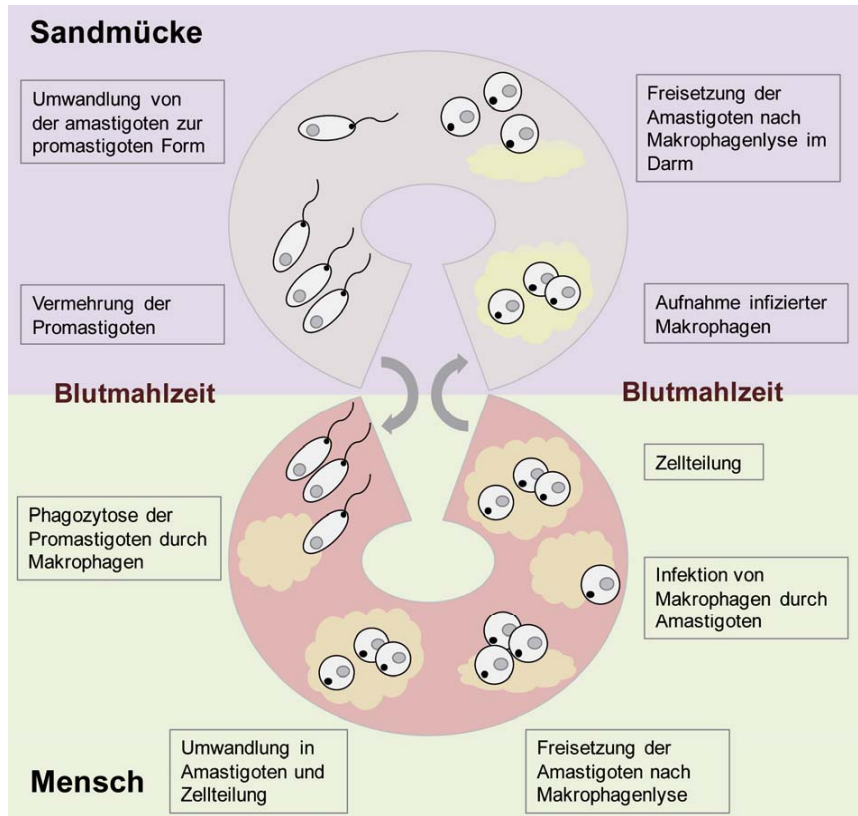


Abb. 1.1: Entwicklungszyklus der Leishmanien

Weltweit sind ca. 350 Millionen Menschen in 98 Ländern und Gebieten in Asien, Afrika, Europa und Amerika von einer Erkrankung bedroht. Die jährliche Inzidenz beläuft sich auf 2 Millionen Fälle.⁵ Der Infektionsverlauf wird maßgeblich von der Erregerart und der Immunantwort des Wirtes bestimmt und manifestiert sich in drei sehr unterschiedlichen Hauptformen^{4, 6-7}:

1. Kutane Leishmaniose ("Orientbeule")

Kutane Leishmaniosen entwickeln sich aus Infektionen mit *L. major*, *L. tropica* oder *L. aethiopica*. In der Regel breiten sich die Erreger nicht aus, sondern bleiben im Bereich des Sandmückenstichs lokalisiert. Dort führen sie zu Hautulzerationen, die meistens unter Narbenbildung selbst heilen.

2. Mukokutane Leishmaniose

Die mukokutane Leishmaniose, ausgelöst u.a. durch *L. braziliensis* ("Espundia"), kann einen schwerwiegenderen Verlauf haben. Neben den Hautläsionen kann es später zu Rezidiven mit destruktiven Veränderungen im Bereich von Mund, Nase und Rachen kommen, die zu massiven Gesichtsentstellungen führen. Abgesehen von Sekundärinfektionen leiden die Betroffenen auch unter der aus der Verstümmelung resultierenden Stigmatisierung.

3. Viszerale Leishmaniose ("Kala-Azar")

Bei der viszeralen Leishmaniose (Erreger: *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi*) befallen die Leishmanien auch die Phagozyten anderer Organe, hauptsächlich die der Leber, der Milz, des Knochenmarks und der Lymphknoten. Fieber, Hepatosplenomegalie und progrediente Anämie sind einige Symptome, die bei dieser Form der Leishmaniose auftreten, welche unbehandelt meistens einen letalen Ausgang hat. Allerdings wird häufig auch ein asymptomatischer Verlauf beobachtet. Ein geschwächtes Immunsystem bedingt durch z. B. Mangelernährung, Einnahme von Immunsuppressiva oder virale Infektionen (z. B. HIV-Infektion) kann den Ausbruch einer viszeralen Leishmaniose begünstigen.⁵

Verschiedene Faktoren erleichtern die Ausbreitung der Erkrankungen. Dazu zählen Migration, Neubesiedelung von Gebieten mit endemisch vorkommender Leishmaniose, geringer Hygiene- und Ernährungsstatus, Armut und Krieg. Ebenso spielt die fehlerhafte Anwendung der Arzneistoffe eine Rolle, besonders bei der in den letzten Jahren entwickelnden Resistenz gegenüber den fünfwertigen Antimonverbindungen. Beeinflusst wird die Wirksamkeit der eingesetzten Antiprotozoika von der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Leishmanien-Spezies und der Immunantwort des Menschen.⁸

Strategien zur Eindämmung der Leishmaniose umfassen u.a. eine Vektor- bzw. Reservoirkontrolle. Als weitere präventive Maßnahme wäre eine Schutzimpfung von großer Bedeutung. Im Bereich der Impfstoffentwicklung wurde in den letzten Jahren stark geforscht, dennoch ist derzeit noch keine effektive Vakzine für die humane Leishmaniose zugelassen.⁹ Des Weiteren steht die Entwicklung von hochsensitiven und spezifischen Tests zum Erregernachweis im Vordergrund. Diese sollten reproduzierbar, preiswert und einfach durchführbar sein. Voraussetzung für eine frühzeitige und adäquate Behandlung, speziell der viszerale Leishmaniose, ist eine sichere Diagnosestellung.¹⁰

1.2 Medikamentöse Therapie der Leishmaniose

1.2.1 Pentavalente Antimonverbindungen

Seit den 1940er Jahren werden die fünfwertigen Antimonverbindungen Natrium-Stibogluconat (Pentostam®, SSG) und Meglumin-Antimonat (Glucantime®, MA) als Mittel der Wahl zur Behandlung der Leishmaniose eingesetzt. Als Ausnahme ist hier der indische Bundesstaat Bihar zu nennen, wo eine starke Resistenzentwicklung zu beobachten ist.⁸ Geringe Therapiekosten, ein wichtiges Kriterium für ärmere Länder, und die gleichzeitig gute Wirksamkeit zählen zu den Vorteilen dieser Wirkstoffe. Während Pentostam® Gluconsäure als Komplexbildner enthält, ist Glucantime® mit *N*-Methyl-D-Glucamin (NMG) komplexiert. Frézard et al. führten osmolarimetrische und massenspektrometrische Untersuchungen zur Strukturaufklärung durch. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Verbindungen in konzentrierten wässrigen Lösungen als Gemische vorliegen, in denen 2:2, 2:3 und 2:1 Antimon-Ligand-Komplexe vorherrschen. Die Arbeitsgruppe bevorzugt die Struktur **1** für das massenspektrometrisch nachgewiesene Anion des 2:2-SSG-Komplexes.¹¹ Roberts et al. ordnen einem massenspektrometrisch identifizierten Kation aus Meglumin-Antimonat die Struktur **2** zu.¹²

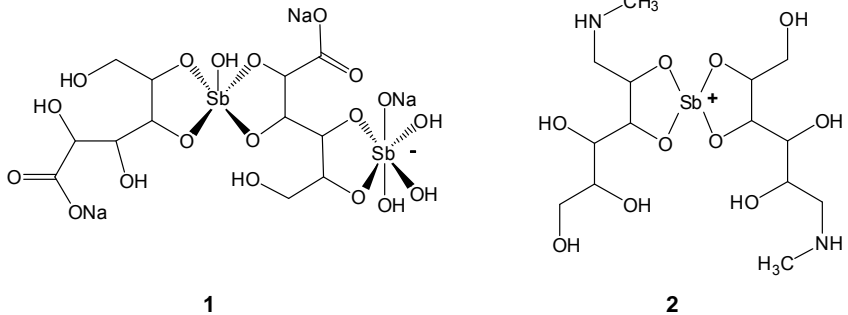


Abb. 1-2: Für den 2:2-Komplex in Natrium-Stibogluconat angenommene Formel **1** und massenspektrometrisch nachgewiesenes Kation **2** aus Meglumin-Antimonat

Bei den pentavalenten Antimonverbindungen handelt es sich um Prodrugs, die durch Reduktion zu ihrer dreiwertigen Form aktiviert werden. Ob dies enzymatisch oder nicht-enzymatisch abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Ähnlich verhält es sich mit der Frage, wo sich diese Reaktion genau abspielt. Neben dem Amastigoten kommen auch der Makrophage oder möglicherweise beide als Ort der Bioaktivierung in Betracht.

Obwohl beide Arzneistoffe schon sehr lange angewandt werden, ist der Wirkmechanismus noch Gegenstand der Forschung. Inhibition der Glykolyse und der β -Oxidation von Fettsäuren sowie die Induktion des Zelltods durch DNA-Fragmentation werden diskutiert.¹³⁻¹⁴ Ein anderes interessantes Target ist die Trypanothion-Reduktase. Dieses für Trypanosomatiden spezifische Enzym spielt eine essentielle Rolle im Thiolstoffwechsel der Erreger, da es das Trypanothion in seiner reduzierten Form hält. Trypanothion, ein Konjugat aus Glutathion und Spermidin, reguliert den Redoxstatus im Erreger und dient der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies. Bricht dieses Redoxsystem zusammen, sterben die Zellen ab.¹⁵ Basierend auf einer Kristallstrukturanalyse entdeckten Baiocco et al., dass das trivalente Antimon die Trypanothion-Reduktase in seiner reduzierten Form inhibiert. Sb^{III} wird in der Nähe des aktiven Zentrums gebunden und ist tetraedrisch koordiniert an zwei Cystein-Seitenketten, einem Threonin- und einem Histidin-Rest.¹⁶

Als Nachteile der Therapie mit Natrium-Stibogluconat bzw. Megluminantimonat sind die parenterale Applikation, die lange Therapiedauer, kardiale und abdominale Nebenwirkungen und die sich immer stärker entwickelnde Resistenz zu sehen.

1.2.2 Amphotericin B

Amphotericin B (**3**) ist ein makrozyklisches, antifungales Polyenantibiotikum, gebildet von *Streptomyces nodosus*, das als Therapeutikum zweiter Wahl bei der Leishmaniose eingesetzt wird. In Gebieten mit hoher Resistenz gegenüber Antimonverbindungen wird es allerdings als Mittel der ersten Wahl verwendet. Charakterisiert wird die chemische Struktur durch einen 38-gliedrigen Ring mit einem lipophilen Bereich bestehend aus sieben konjugierten Doppelbindungen, und eine hydrophile Region, welche die OH-Gruppen, eine Carboxylgruppe und einen O-glykosidisch gebundenen Aminosucker beinhaltet. Das Molekül liegt in einer zwitterionischen Struktur vor und bildet ein transannulares Halbacetal.

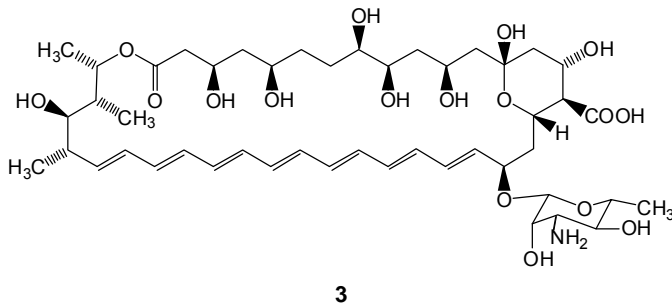


Abb. 1-3: Polyenantibiotikum Amphotericin B (**3**)

Der Wirkmechanismus beruht auf einer Interaktion von Amphotericin B mit dem Zellmembranbaustein Ergosterol, der in Pilzen und Leishmanien, aber nicht im Menschen vorhanden ist. Der Zelltod resultiert aus einer erhöhten Membrandurchlässigkeit aufgrund der kanalartigen Form des Ergosterol-Amphotericin B-Komplexes.¹⁷

Da auch Säugetierzellen Sterole enthalten, vermutet man, dass auftretende Zellschädigungen durch ähnliche Wirkmechanismen hervorgerufen werden. In erster Linie ist hier die Nephrotoxizität zu erwähnen, die jedoch durch Verwendung von Lipidzubereitungen gesenkt werden kann.¹⁸ Kommerziell verfügbar sind u.a. folgende

Zubereitungen: AmBisome[®], ein liposomal formuliertes Amphotericin B, Amphocil[®] (ABCD), ein 1:1 Komplex aus Amphotericin B und Cholesterylhydrogensulfat und Abelcet[®] (ABLC), das den Wirkstoff als Lipid-Komplex enthält.¹⁹ Die Applikation erfolgt parenteral, weil die Bioverfügbarkeit bei peroraler Gabe nicht ausreichend ist. Trotz seiner guten Wirksamkeit wird der Wirkstoff nur begrenzt eingesetzt, weil die Therapiekosten sehr hoch sind.

Berichte über auftretende Rückfälle, speziell bei HIV-Patienten, liegen vor. Dennoch scheinen Resistenzentwicklungen augenscheinlich noch kein Problem zu sein.²⁰ Die Gefahr, die eine steigende Anwendung und die längere Halbwertszeit der liposomalen Formulierung mit sich bringt, darf jedoch nicht unterschätzt werden.⁸ Mbongo et al. stellten bei resistenten Promastigoten fest, dass Ergosterol von einem anderen Sterol in der Zellmembran substituiert wird.²¹

1.2.3 Miltefosin

Miltefosin (**4**), ein Hexadecylphosphocholin, ist der neueste Wirkstoff in der Leishmaniose-Therapie. Ursprünglich als antitumoraler Wirkstoff entwickelt, wurde in den 1980er Jahren seine antileishmanielle Aktivität entdeckt. Andere Vertreter der Phospholipide, z. B. das Alkylglycerophosphocholin Edelfosin, zeigen ähnliche Wirkungen und bilden eine neue Klasse antiprotozoischer Substanzen.²²

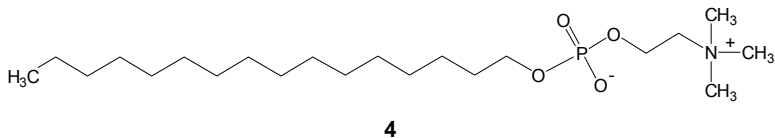


Abb. 1-4: Miltefosin (**4**)

Eine in Indien durchgeführte Phase-IV-Studie belegte die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit von Miltefosin.²³ Sein großer Vorteil der oralen Anwendung wird von teratogenen und gastrointestinalen Nebenwirkungen sowie hohen Behandlungskosten beeinträchtigt.¹⁰ Frauen im gebärfähigen Alter müssen während der Therapie und noch drei Monate danach eine sichere Kontrazeption erhalten. Außerdem erschwert die 28-tägige Behandlung sehr oft die Compliance.

In der Literatur existieren verschiedene Aussagen zu den pharmakodynamischen Eigenschaften der Substanz. Die Ergebnisse von Luque-Ortega et al. zeigten, das

Miltefosin die Cytochrom-c-Oxidase in *L. donovani* hemmt, während andere Untersuchungen auf ein Einwirken auf den Phosphatidylinositol-Metabolismus, den Ca^{2+} -Flux und die Proteinkinase C hinweisen.²⁴⁻²⁵

Wachsende Rückfallraten während einer Phase-IV-Studie in Indien könnten erste Hinweise auf eine mögliche Resistenzentwicklung sein.²⁶ Die steigende Anwendung und der Fehlgebrauch von Miltefosin sowie die lange Halbwertszeit (150 – 200 Stunden) können diese Entwicklung zusätzlich begünstigen. *In vitro* erzeugte resistente Leishmanien zeichnen sich u. a. durch eine abnehmende Arzneistoffaufnahme infolge eines defekten P-Typ Transporters oder eine erhöhte zelluläre Wirkstoff-Eliminierung durch eine verstärkte P-Glykoprotein-Expression aus.²⁷⁻²⁸ Besorgniserregend ist die Tatsache, dass man diese Resistenz sehr leicht hervorrufen kann. Welche Mechanismen *in vivo* für ein vermindertes Ansprechen verantwortlich sind, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.2.4 Pentamidin

Pentamidin ist ein symmetrisches Bisamidin, das in Form seines Pentamidinisethionat-Salzes (**5**) (Pentacarinat®) im Handel ist. Weitere Indikationsgebiete sind Infektion mit Trypanosomen und mit *Pneumocystis carinii*. Pentamidin wird intramuskulär oder intravenös verabreicht. Der Arzneistoff wird wegen seiner Nebenwirkungen (renale Toxizität, hypotensive Krisen und metabolische Störungen) nur noch begrenzt angewandt.⁵

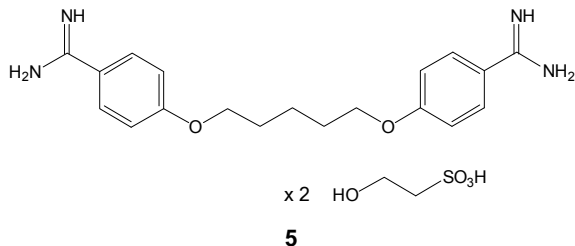
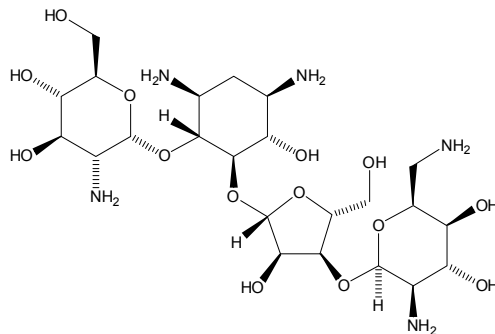


Abb. 1-5: Pentamidinisethionat (**5**)

Die kationische Struktur ist essentiell für die Wirksamkeit, allerdings ist der exakte Wirkmechanismus noch nicht endgültig geklärt. Zytotoxische Effekte infolge von DNA- und Proteinkonformationsveränderungen zeigten sich bei *L. infantum*-Promastigoten.²⁹ Andere Arbeiten weisen auf eine potentielle, in den Mitochondrien lokalisierte Zielstruktur hin.³⁰ Die in Indien auftretende verminderte Wirksamkeit des Pentamidins könnte eine Resistenzentstehung anzeigen.²⁰

1.2.5 Paromomycin

Das als Aminoglykosid-Antibiotikum bekannte Paromomycin (**6**) besitzt ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien und Protozoen. Die Substanz verfügt über ein in den Positionen 1 und 3 basisch substituiertes Aglykon, das Cyclit, welches über die 4-Hydroxylgruppe mit 2-*D*-Glucosamin und über die 5-Hydroxylgruppe mit einer Kette aus *D*-Ribose und einem Diaminozucker verknüpft ist. Die im Handel befindlichen Arzneiformen beinhalten Paromomycinsulfat.



6

Abb. 1-6: Aminoglykosid-Antibiotikum Paromomycin (**6**)

Seit 2006 ist der Arzneistoff zur intramuskulären Anwendung bei viszeraler Leishmaniose in Indien zugelassen. 667 Patienten im Alter zwischen 5 und 55 Jahren, erkrankt an viszeraler Leishmaniose, nahmen an einer Phase-III-Studie in Bihar, Indien teil. Es zeigte sich, dass Paromomycin einer Standardmedikation mit Amphotericin B nicht unterlegen war. Eine hohe Heilungsrate (95%) und eine gute Verträglichkeit waren die positiven Ergebnisse dieser Untersuchungen. Sogar die bekannten oto- und nephrotoxischen Effekte traten nur geringfügig auf. Weitere

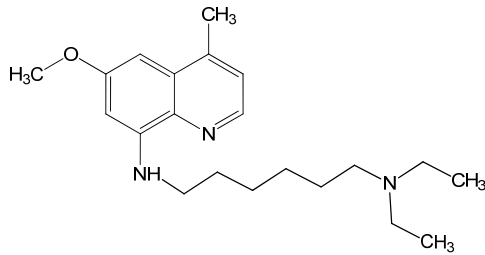
Vorteile sind die geringen Kosten und die kürzere Therapiedauer. Nebenwirkungen waren Schmerzen an der Injektionsstelle und Anstieg der Transaminasen.³¹

Bei kutaner Leishmaniose kann der Wirkstoff parenteral oder lokal appliziert werden. Die Effektivität der Kombination von Paromomycin mit entweder Methylbenzethoniumchlorid, Harnstoff oder Gentamycin in einer lokalen Formulierung wurde in etlichen Studien geprüft. Der Therapieerfolg wurde maßgeblich von der Erregerart und der Behandlungsdauer bestimmt. Die Zusammensetzung Paromomycin und Methylbenzethoniumchlorid war einer Monotherapie in klinischen Untersuchungen überlegen.³² Eine lokale Therapie hat weniger Nebenwirkungen, ist kostengünstiger und einfacher anzuwenden.

In Bakterien greifen die Aminoglykosidantibiotika in die Proteinbiosynthese ein, indem sie an die 30s-Untereinheit bakterieller Ribosomen binden. Folglich kommt es zu Fehlern beim Ablesen der mRNA. Die Arbeitsgruppe Maarouf et al. fand heraus, dass Paromomycin zu einer Wachstumshehmung in Promastigoten (*L. donovani*) führt, indem es die RNA- und Proteinsynthese inhibiert, die Membranfluidität vermindert und die Aufnahme bestimmter Substanzen verändert.³³ In anderen Versuchen konnten sie Wechselwirkungen zwischen leishmaniellen Ribosomen bzw. Mitochondrien und dem Aminoglykosidantibiotikum erkennen.³⁴⁻³⁵ Bei *in vitro* erzeugten resistenten *L. donovani*-Promastigoten wurde eine verminderte Aufnahme des Paromomycin festgestellt.³⁶

1.3 Entwicklung neuer antileishmanieller Wirkstoffe

WR6026, heute unter dem Namen Sitamaquin (**7**) bekannt, ist ein 8-Aminochinolin-Derivat. Das englische Pharmaunternehmen GlaxoSmithKline hat diesen oral applizierbaren Wirkstoff entwickelt, der in einer Phase-II-Studie in Kenia und Indien an Patienten mit viszeraler Leishmaniose getestet worden ist.³⁷ Der Wirkstoff ist derzeit nicht mehr in der Entwicklung, da er u.a. zu geringe Heilungsraten (< 90%) gezeigt hat.³⁸



7

Abb. 1-7: 8-Aminochinolinderivat Sitamaquin (7)

Arzneistoffkombinationen sind ein wichtiges Instrument in der Therapie der Infektionskrankheiten. Synergistische oder additive Effekte, geringere Dosen und folglich weniger Nebenwirkungen und Kosten sind die Vorzüge einer solchen Behandlung. Daneben erreicht man auch ein breiteres Wirkspektrum, höhere Heilungsraten und der Gefahr einer Resistenzentwicklung wird entgegengesteuert. Zwischen 2008 und 2009 wurde in einer Studie in Indien die Wirksamkeit verschiedener Kombinationen antileishmanieller Arzneistoffe bei der viszerale Leishmaniose untersucht. Amphotericin B wurde in drei unterschiedlichen Therapieschemata mit Paromomycin und Miltefosin kombiniert, wobei die verkürzte Behandlungsdauer ein wesentlicher Aspekt war. Die Kombinationen erwiesen sich bei verkürzter Anwendung als effizient und sicher, und waren einer Standardbehandlung mit Amphotericin B nicht unterlegen.³⁹

Zahlreiche Arbeiten wurden veröffentlicht, die von Pflanzeninhaltsstoffen (u.a. Chinone, Alkaloide, Terpene, Phenolderivate) mit antileishmanischer Aktivität berichten. Leider werden diese antiprotozoischen Eigenschaften oft von unerwünschten Effekten wie Toxizität, geringer Löslichkeit und schlechter Bioverfügbarkeit begleitet.⁴⁰ Obwohl sie bisher noch nicht in der antileishmanischen Chemotherapie vertreten sind, bieten sie eine Vielzahl von Leitstrukturen, die für die Entwicklung neuer Substanzen von großem Interesse sind. 8-Aminochinoline, Hydroxynaphthochinone und in 2-Position substituierte Chinoline sind Verbindungsklassen, für die schon eine *in vivo* Aktivität dargelegt werden konnte.⁴¹

Abgesehen von der Notwendigkeit neue Arzneistoffe zu entwickeln, kommt der Galenik, also der Arzneiform, eine erhebliche Bedeutung zu. Liposomen und

Nanopartikel können die Effektivität, Selektivität, Veträglichkeit und Stabilität antiparasitärer Wirkstoffe deutlich verbessern.⁴²

1.4 Durch Trypanosomen verursachte Infektionen

Zu den durch Trypanosomen verursachten Erkrankungen zählen die Afrikanische und Amerikanische Trypanosomiasis. Die Afrikanische Schlafkrankheit (Afrikanische Trypanosomiasis) ist eine Infektionskrankheit, ausgelöst durch zwei unterschiedliche Subspezies von *Trypanosoma brucei*: *Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Für die Amerikanische Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit) ist der Erreger *Trypanosoma cruzi* verantwortlich. In dieser Arbeit wird nur auf die von *Trypanosoma brucei* hervorgerufene Afrikanische Schlafkrankheit eingegangen.

Charakteristisch für die Trypanosomen sind morphologische Unterschiede der Erregerformen im Verlauf des Generationswechsels. Der Vektor dieser Erreger ist die Tsetse-Fliege (*Glossina spp.*), die beim Blutsaugen die im Speichel enthaltenden Trypanosomen (metazyklische Form) auf den Menschen überträgt. Im Blut wandeln sich die Trypanosomen in ihr trypomastigotes Stadium um. Dort treten die Erreger in unterschiedlicher Gestalt auf: die sich teilende, langgestreckte „long-slender“-Form bei ansteigender Parasitämie und die kurze, nicht proliferierende „short-stumpy“-Form. Letztere tritt neben der erst genannten Form ab einer bestimmten Parasitendichte auf. Die Trypanosoma-Blutformen bilden variantenspezifische Oberflächenantigene, die zu einer Antigenvarianz der Zellmembran führt und vor den Abwehrmechanismen des Wirtes schützt. Infektiös für die Tsetse-Fliege ist nur die „short-stumpy“-Form. Nimmt die Tsetse-Fliege während eines Stichs die Trypanosomen von einem infizierten Wirt auf, entwickeln sie sich im Darm zur prozyklischen Form. In der Speicheldrüse des Insektes wandeln sie sich über eine epimastigote Form in die für den Menschen infektiösen, metazyklischen Trypanosomen um.^{4, 43} Im Allgemeinen werden bei *T. b. rhodesiense* die Erreger von Glossinen zwischen Tieren (Wild- und Haustiere) übertragen, seltener dient der Mensch als Parasitenreservoir. Hingegen erfolgt die Übertragung bei *T. b. gambiense* primär von Mensch zu Mensch. Gelegentlich treten Tiere (u.a. Hausschwein, Hund, Rind) als Nebenwirt auf.⁴

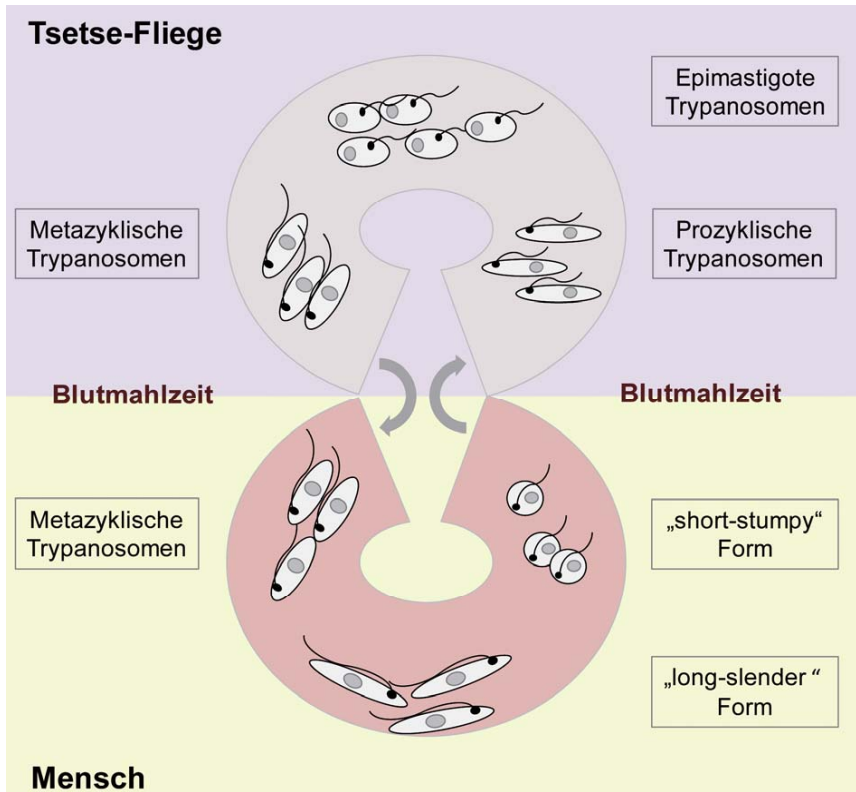


Abb. 1.8: Entwicklungszyklus von *T. b. gambiense* und *rhodesiense*

Das Verbreitungsgebiet der Afrikanischen Schlafkrankheit ist auf den subsaharischen Bereich des afrikanischen Kontinents beschränkt und tritt vornehmlich in abgelegenen ländlichen Gebieten auf, deren medizinische Versorgung meistens eingeschränkt ist. Laut World Health Organization wird die Zahl der aktuellen Fälle gegenwärtig auf 30.000 geschätzt, wobei jedoch die Dunkelziffer nicht gemeldeter oder diagnostizierter Fälle berücksichtigt werden muss.⁴⁴

Die Trypanosoma-Spezies bestimmt, ob die Erkrankung in einer akuten bzw. chronischen Form verläuft. In West- und Zentralafrika führt *Trypanosoma brucei gambiense* zu einem chronischen Verlauf, während *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Ost- und Zentralafrika die akute Form hervorruft. In beiden Fällen ist der Krankheitsverlauf durch zwei Stadien charakterisiert, die sich aber in ihrem zeitlichen Ablauf unterscheiden. Eine zu Beginn der Infektion auftretende

entzündliche Schwellung an der Einstichstelle, auch „Primäraffekt“ oder „Trypanosomenschanker“ genannt, tritt nicht in allen Fällen auf. Stadium I wird als febril-glanduläre oder hämolympathische Phase bezeichnet, in der mitunter intermittierendes Fieber, Lymphknotenschwellung, Kopf-, Glieder- und Muskelschmerzen sowie Exantheme auftreten. Sind die Erreger in das zentrale Nervensystem eingedrungen, tritt das Stadium II ein, die meningoenzephalitische Phase. Charakteristisch ist die Ausbildung einer chronischen Enzephalopathie, begleitet von neurologischen Störungen wie einem veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus, Krampfanfällen, Somnolenz, Koma und Apathie. Unbehandelt verläuft die Afrikanische Schlafkrankheit tödlich. Infektionen mit *Trypanosoma brucei rhodesiense* haben eine Inkubationszeit von 14 bis 21 Tagen, verlaufen schwerwiegender und die meningoenzephalitische Phase wird schon häufig nach einigen Wochen erreicht. Bei der westafrikanischen Schlafkrankheit kann die Krankheitsdauer beider Stadien Monate bis Jahre andauern.^{4, 45}

Eine Schutzimpfung für die Afrikanische Schlafkrankheit steht derzeit nicht zur Verfügung. Die bereits erwähnte Antigenvarianz des Erregers und seine Fähigkeit, sich vor den Abwehrmechanismen des humanen Immunsystems zu schützen, sind ein großes Problem bei der Impfstoffentwicklung.⁴⁶

Entscheidend für eine effektive Behandlung ist die rechtzeitige und sichere Diagnose der Erkrankung, weil die jeweiligen Krankheitsstadien einer unterschiedlichen Therapie bedürfen. Der direkte Erregernachweis kann aus dem Blut und dem Lymphknotenpunktat und im späteren Stadium auch aus dem Liquor erfolgen. Alternativ kommen auch serologische Tests zum Nachweis von speziellen Antikörpern zur Anwendung. Daneben werden PCR-Techniken zur Charakterisierung der Parasiten-DNS eingesetzt.⁴⁵

In den letzten 100 Jahren veränderte sich die Prävalenz weitgehend durch den Einsatz von Kontroll- und Interventionsprogrammen, die auf frühzeitiger Diagnose und Behandlung sowie Vektorkontrolle und Überwachung der tierischen Erregerreservoirs beruhen. Die Diagnosestellung für *T. b. rhodesiense*- und *T. b. gambiense*-Infektionen erfolgt in drei Schritten: Screening, Nachweis des Erregers und Bestimmung des Krankheitsstadiums, wobei die jeweils angewandten Untersuchungen von der Erregerart abhängig sind. Der Einsatz von Insektiziden und Fliegenfallen sind Maßnahmen, die die Vektorkontrolle unterstützten. Bei Rindern

wurden Insektizide lokal appliziert, um eine Infektion mit Trypanosomen zu verhindern.⁴⁶

Die Ausbreitung der Erkrankung wird durch anhaltende Bürgerkriege, Völkerwanderungen, Armut und geringe medizinische und hygienische Grundversorgung erleichtert. Außerdem sind in Kriegsgebieten Kontroll- und Interventionsprogramme schwer durchführbar.⁴⁵

1.5 Medikamentöse Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit

1.5.1 Suramin

Suramin, ein symmetrisches Harnstoffderivat, wird als Mittel der ersten Wahl im Stadium I der *T. b. rhodesiense*-Infektion verwendet. Der Arzneistoff wird in Form seines gut wasserlöslichen Natriumsalzes (**8**) zur parenteralen Applikation eingesetzt. Suramin liegt bei physiologischem pH als sechsfach negativ geladenes Ion vor und kann deshalb die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Aus diesem Grund ist der Wirkstoff nicht indiziert für das enzephalitische Stadium.

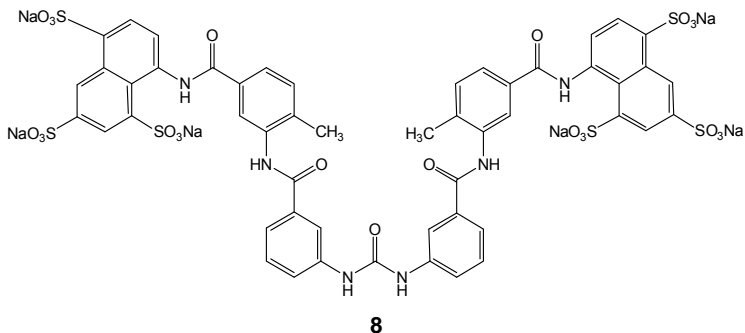


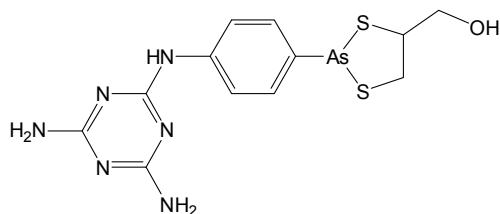
Abb. 1-9: Suramin-Natrium (**8**)

Während einer Therapie mit Suramin können Übelkeit, Erbrechen, Neuropathien und Nephrotoxizität (reversibel) als Nebenwirkungen auftreten.⁴⁷ Die hohe Plasma-eiweißbindung des Wirkstoffs, speziell für das *low density lipoprotein* (LDL), führte zu der Idee, dass Suramin über den LDL-Rezeptor der Trypanosomen in diese aufgenommen wird.⁴⁸ Jedoch deuten die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Pal et al. darauf hin, dass die Aufnahme des Suramins wahrscheinlich über eine von LDL unabhängige rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt.⁴⁹

Mit Hilfe ihrer negativen Ladung interagiert die Substanz mit vielen Enzymen. Die Hemmung verschiedenster Enzyme (z. B. RNA-Polymerase, Hexokinase, Thymidinkinase, Dihydrofolat-Reduktase) trägt zur antitrypanosomalen Aktivität bei, jedoch ist der genaue Wirkmechanismus noch ungeklärt. Dieser multifaktorielle Wirkmechanismus könnte auch begründen, warum momentan Resistenzen noch keine Rolle spielen.⁴⁹⁻⁵⁰

1.5.2 Melarsoprol

Die dreiwertige Arsenverbindung Melarsoprol (**9**) kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird deshalb zur Behandlung des zweiten Stadiums beider Formen der Afrikanischen Schlafkrankheit verwendet. Melarsoprol entsteht bei der Reaktion von Melarsenoxid mit Dimercaprol (2,3-Dimercaptopropanol), einem im zweiten Weltkrieg entwickeltem Antidot gegen den arsenhaltigen Kampfstoff Lewisit. Durch die Kombination mit Dimercaprol konnte die Arsentoizität des Melarsenoxids verringert und gleichzeitig die Aufnahme über die Blut-Hirn-Schranke verbessert werden. Das wasserunlösliche Melarsoprol wird als 3,6%ige Lösung in Propylen-glykol intravenös appliziert.^{48, 51}



9

Abb. 1-10: Dreiwertige Arsenverbindung Melarsoprol (**9**)

Schwere unerwünschte Wirkungen wie Enzephalopathien, gastrointestinale Beschwerden, Fieber, Hautreaktionen und Polyneuropathien verdeutlichen, warum ein stationärer Aufenthalt bei einer Melarsoprol-Behandlung erforderlich ist. Besonders problematisch ist die Ausbildung einer lebensbedrohenden Enzephalopathie, die in vielen Fällen letal verläuft.⁵²

Zielstrukturen des Arzneistoffs sind Enzyme mit Sulfhydrylgruppen, die unter Ausbildung von kovalenten Arsen-Schwefel-Bindungen inhibiert werden.⁴⁸ Eine

Wechselwirkung tritt auch zwischen der Trypanothionreduktase und Melarsenoxid auf. Welcher Mechanismus für die antitrypanosomale Aktivität entscheidend ist, ist nicht bekannt.⁵³ Im Körper wird Melarsoprol sehr schnell zu Melarsenoxid umgewandelt, welches mit Hilfe des Aminopurin-P2-Transporters in die Trypanosomen gelangt. Wahrscheinlich geht die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber Melarsoprol auf den Verlust dieses Transporters zurück.⁵⁴

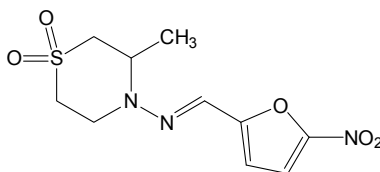
1.5.3 Pentamidin

Wie unter 1.2.4 beschrieben, ist Pentamidin nicht nur bei der Leishmaniose wirksam, sondern auch bei Trypanosomen. Es wird im ersten Stadium der Infektion mit *Trypanosoma brucei gambiense* empfohlen. Nachdem die Erreger in das zentrale Nervensystem eingedrungen sind, ist der Arzneistoff nicht mehr effektiv. Pentamidin wird als Pentamidinisethionat (**5**) intramuskulär oder intravenös verabreicht.

Für die Aufnahme des Pentamidins in die Trypanosomen sind der Purin-Transporter P2 und zwei Pentamidin-Transporter verantwortlich. Eine Erklärung für die exakte Wirkweise der Substanz existiert noch nicht. Als Targets werden beispielsweise das Mitochondrium und die DNA diskutiert.⁵⁵ Ein Therapieversagen mit Pentamidin ist vermutlich auf eine falsche Diagnose des Krankheitsstadiums zurückzuführen.⁵⁰

1.5.4 Nifurtimox

Nifurtimox (**10**), ein 5-Nitrofuran-Derivat, ist zugelassen zur Behandlung der Amerikanischen Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit). Das oral applizierbare Nifurtimox wird in Kombination mit Eflornithin bei Infektionen mit *Trypanosoma brucei gambiense* im Stadium II eingesetzt, da es als Monotherapie nicht ausreichend wirksam ist.^{3, 55}



10

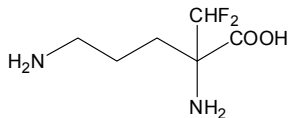
Abb. 1-11: Nifurtimox (**10**)

In einer Studie wurde gezeigt, dass die Nifurtimox-Eflornithin-Kombinationstherapie (NECT) einer standardisierten Eflornithin-Therapie bezüglich der Wirksamkeit nicht unterlegen war. Eine verkürzte und vereinfachte Applikation, gute Verträglichkeit sowie geringere Therapiekosten sind weitere Vorteile, die die NECT auszeichnen.⁵⁶ Gastrointestinale und neurologische Nebenwirkungen können bei Gabe von Nifurtimox beobachtet werden.⁴⁷

Nifurtimox, ein Prodrug, wird nach Aufnahme in die Trypanosomen in seine eigentliche Wirkform umgewandelt. Untersuchungen deuten darauf, dass für diese Reaktion zwei Nitroreduktasen in Frage kommen können. In Abhängigkeit von der Nitroreduktase können bei dieser Reduktion aktive Metabolite oder in nachfolgenden Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Für die trypanozide Wirkung werden die zellschädigenden Eigenschaften der aktiven Metabolite und reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich gemacht.^{48, 57}

1.5.6 Eflornithin

Bei dem Antiprotozoikum Eflornithin (**11**) handelt es sich chemisch um α -Difluormethylornithin (DFMO), ein Analogon der Aminosäure Ornithin, das zu Beginn seiner Entwicklung als antitumoraler Wirkstoff vorgesehen war.



11

Abb. 1-11: Eflornithin (**11**)

Eflornithin hemmt irreversibel die Ornithindecaboxylase (ODC), ein wichtiges Enzym in der Polyaminbiosynthese. Infolge der Inhibition wird u.a. die Bildung bestimmter Polyamine, die essentiell für Wachstum und Differenzierung der Trypanosomen sind, unterbunden.⁵⁸ Die humane ODC wird von Eflornithin ebenfalls gehemmt, allerdings wird sie schnell wieder durch neugebildetes Enzym ersetzt. DFMO ist nur wirksam bei *Trypanosoma brucei gambiense*, weil die Halbwertszeit der ODC bei 20 Stunden liegt, während sie bei *Trypanosoma brucei rhodesiense* nur etwa 3.5 – 4 Stunden beträgt.⁴⁸

Eflornithin wird in der enzephalitischen Phase der Krankheit nach einem sehr aufwendigen Therapieschema intravenös verabreicht. Hinzu kommt, dass die Behandlung eine kostenintensive medizinische Ausstattung erfordert.³ Zu den Nebenwirkung gehören u. a. gastrointestinale Störungen, Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie und Konvulsionen.⁵⁴ In diesem Zusammenhang stellt die Kombinationstherapie mit Nifurtimox eine sichere, günstigere und leichter anzuwendende Behandlung dar.⁵⁶

1.6 Entwicklung neuer trypanozider Wirkstoffe

Die DNDI (Drugs for Neglected Diseases initiative) untersuchte mehr als 700 Nitroheterozyklen, hauptsächlich Nitroimidazole, und entdeckte Fexinidazol (**12**), ein 5-Nitroimidazol-Derivat, als vielversprechenden Wirkstoffkandidaten wieder. Im Tierversuch erwies sich die Verbindung in beiden Stadien der Afrikanischen Schlafkrankheit als wirksam. Der Arzneistoff ist oral verfügbar und könnte somit eine leichtere Anwendung ermöglichen.⁵⁹ Nachdem die DNDI die präklinischen Studien erfolgreich abgeschlossen hatte, wurde von September 2009 bis Ende 2010 die Phase I der klinischen Entwicklung durchgeführt.⁶⁰

SCYX-7158 (**13**), auch als AN 5568 registriert, ist eine weitere interessante Verbindung, die für die orale Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit in Frage kommen könnte. In vorklinischen Untersuchungen erwies sich das Benzoxaborol-Derivat als sicher und effektiv, auch im Stadium II der afrikanischen Trypanosomiasis. Der Wirkstoffkandidat SCYX-7158 wird demnächst in einer klinischen Studie Phase I geprüft.⁶¹

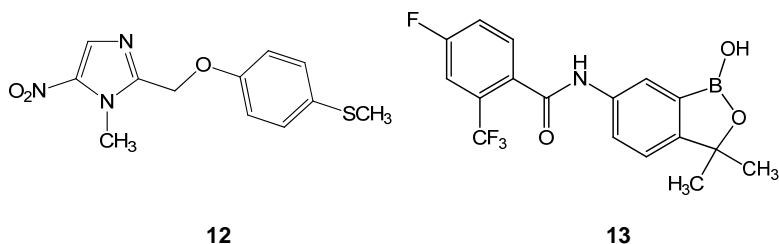
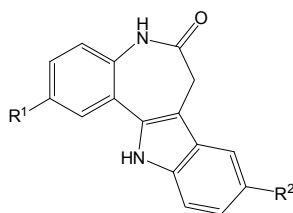


Abb. 1-12: Fexinidazol (**12**) und das Benzoxaborol-Derivat SCYX-7158 (**13**)

1.7 Paullon-Chalkon-Hybride

Bei Paullonen handelt es sich um 7,12-Dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-one **14**, eine als Proteinkinaseinhibitoren bekannte Substanzklasse, deren Vertreter die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1), die Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) hemmen. Außerdem wurde im Rahmen einer Affinitätschromatographischen Untersuchung die mitochondriale Malatdehydrogenase von *L. mexicana* als intrazelluläres Target von Gwennpaullon identifiziert.⁶² Basierend auf diesen Eigenschaften wurden Paullone u. a. im Bereich der Krebs-, Alzheimer- und Diabetes Typ I-Forschung angewandt.⁶³



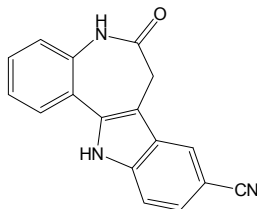
14

Abb. 1-13: Allgemeine Struktur der Paullone **14**

Cyclin-abhängige Kinasen sind phosphorylierende Enzyme, denen eine entscheidende Rolle in der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus zukommt. In *Leishmania mexicana* wurden zwei Kinasen, die Proteinkinasen CRK1 (Cdc2-related-protein kinase 1) und CRK3 (Cdc2-related-protein kinase 3) entdeckt, die eine Verwandtschaft zu den Cyclin-abhängigen Kinasen aufweisen.⁶⁴⁻⁶⁵

Homologe dieser Cyclin-abhängigen Kinasen könnten als Targets bei der Entwicklung neuer antileishmanieller Wirkstoffe in Betracht gezogen werden.⁶⁶ Hassan et al. beobachteten, dass die Proteinkinase CRK3 für den Zellzyklus von *L. mexicana*-Promastigoten essentiell ist.⁶⁷ Nach einem Screening von bekannten Kinase-Inhibitoren konnte die Arbeitsgruppe Grant et al. zeigen, dass einige Substanzen neben der *Leishmania mexicana* CRK-3-Proteinkinase auch das Wachstum von *L. donovani*-Amastigoten in Maus-Makrophagen hemmten. Während dieser Untersuchungen wurde auch ein Paullon, das 9-Cyanopaullon (**15**) an *L. donovani*-Amastigoten getestet. Die Verbindung besaß einen ED₅₀-Wert von

19.6 μM , zeigte aber schon ab einer Konzentration von 10 μM toxische Effekte für die als Wirtszellen fungierenden Maus-Makrophagen.⁶⁸



15

Abb. 1-14: Antileishmaniell wirksames 9-Cyanopauillon (**15**)

Aufgrund dieser Ergebnisse entstand die Idee, antileishmaniell wirksame Pauillon-Derivate mit geringer Toxizität zu entwickeln. Die biologischen Prüfungen wurden von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Charles L. Jaffe an der Hebrew University of Jerusalem in Israel durchgeführt. Methoden zur Untersuchung der Testsubstanzen an axenischen, d.h. extrazellulär kultivierten Amastigoten und an in Makrophagen parasitierenden Leishmanien werden von der Arbeitsgruppe angewendet.

Anfänglich wurde eine Sammlung von 42 im Arbeitskreis vorhandenen Pauillon an axenischen Amastigoten der Art *L. donovani* getestet. Eine deutliche Aktivität wurde bei der Verbindung **16a** mit einem GI_{50} -Wert (Konzentration für die 50%ige Wachstumshemmung) von 3.1 μM beobachtet. Allerdings wurde das Wachstum in Makrophagen kultivierter *L. donovani*-Erreger nicht unterbunden. Die Verbindung erwies sich zudem bei einer Konzentration von 5 μM als toxisch für humane THP-1-Makrophagen.

Um diese Substanz hinsichtlich ihrer Aktivität und Toxizität zu optimieren, wurden Analoga synthetisiert. Aus der Variation des 9-Substituenten resultierte Verbindung **16b**, die eine deutliche Aktivität gegen intrazelluläre Erreger (GI_{50} = 56% Hemmung bei 5 μM) besaß. Jedoch zeigte **16b** toxische Effekte an den Wirtszellen.

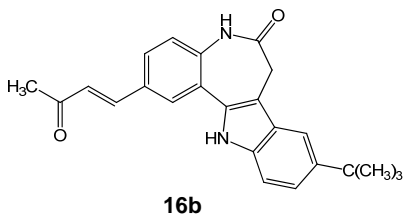
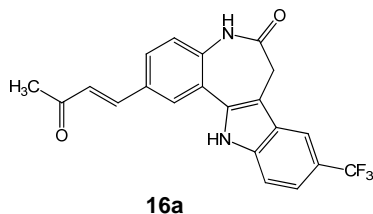


Abb. 1-15: Paullonderivate **16a** und **16b**

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden unter Beibehaltung des *tert*-Butyl-Substituenten in 9-Position Derivate dargestellt, bei denen die der Ketogruppe benachbarte Methylgruppe durch Arylreste ausgetauscht wurde. Reichwald et al. entwickelte für die Synthese dieser Substanzklasse eine neue Variante der Heck-Reaktion unter Verwendung von Keton-Mannich-Basen.⁶⁹ Die resultierenden Verbindungen **17** können als Hybride aus Paullonen und Chalkonen betrachtet werden.

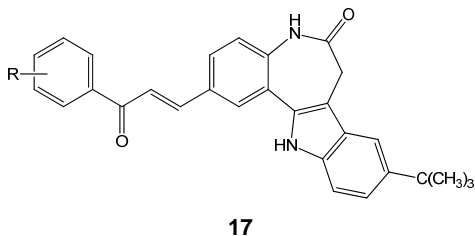
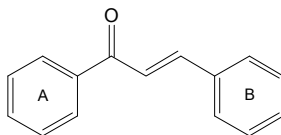


Abb. 1-16: Paullon-Chalkon-Hybrid **17**

Chalkone **18** sind α,β -ungesättigte aromatische Ketone, bei denen zwei Aromaten (Ring A und B) über eine Propenoneinheit miteinander verknüpft sind. Vielfältige pharmakologische Eigenschaften wurden bei synthetischen und natürlichen Chalkonen beobachtet. In der Literatur werden u.a. antiprotozoale, antibakterielle, antientzündliche und antitumorale Effekte beschrieben.⁷⁰ Es existieren zahlreiche Forschungsarbeiten, in denen die Wirkung von Chalkonen auf Leishmanien gezeigt werden konnte. Dabei wird das Aktivitäts-, Selektivitäts- und Toxizitätsprofil der Chalkonanaloge durch das Substitutionsmuster der aromatischen Ringe A und B entscheidend mitbestimmt.⁷¹⁻⁷⁵ Infolgedessen ist es nicht verwunderlich, dass diese

Substanzklasse als Leitstruktur für die Entwicklung zukünftiger antileishmanischer Wirkstoffe in Frage kommt.⁷⁶



18

Abb. 1-17: Allgemeine Struktur der Chalkone **18**

Die biologische Evaluierung der Paullon-Chalkon-Hybride **17** ergab, dass der 9-*tert*-Butylrest des Paullon-Grundgerüsts für die Wirkung gegen intrazellulär parasitierende Amastigoten wichtig ist. Vergleichbare Strukturen ohne Substituenten (z. B. **17a**) oder mit 9-Methylsubstitution hemmten nämlich nicht das Amastigoten-Wachstum in den Makrophagen. Der Austausch der Methylketongruppe der Leitstruktur **16b** gegen bestimmte Arylketone steigerte die Wirkung gegenüber axenischen und intrazellulären Amastigoten und reduzierte zusätzlich die Toxizität für die Wirtszellen.⁷¹ Die entsprechenden Werte für die Analoga **17b** und **17c** sind der Tabelle 1-1 zu entnehmen. Interessanterweise zeigt die Verbindung **17d**, ein Isomer von **17c**, das sich nur im Substitutionsmuster der Methoxygruppen unterscheidet, toxische Aktivität gegen Makrophagen. Es ist ersichtlich, dass für die Toxizität der jeweiligen Moleküle die Substitution am Aromaten der Aroyl-Substruktur von entscheidender Bedeutung ist.⁷¹

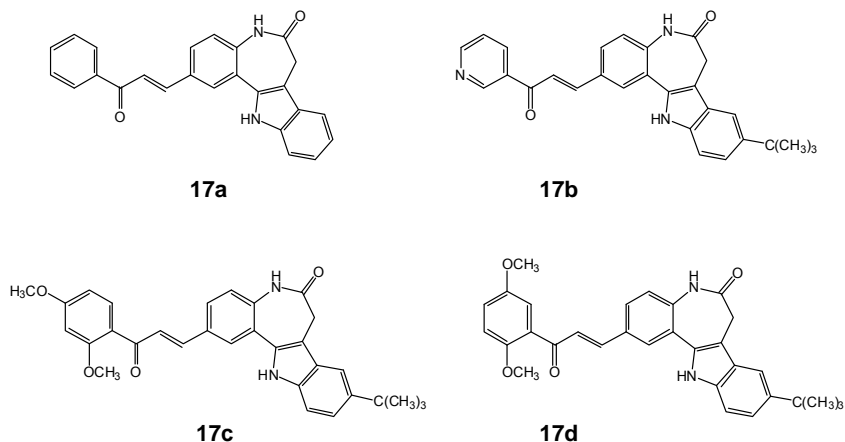


Abb. 1-18: Verschiedene Paullon-Chalkon-Hybride **17a-d**⁷¹

Der Austausch des 2-(3-Aryl-3-oxopropenyl)-Substituenten gegen einen Phenylacetylsubstituenten führte zu dem Paullon-Derivat **19a**, welches sich auch durch antileishmanielle Eigenschaften auszeichnet. Jedoch besitzt **19a** ein ungünstiges Toxizitätsprofil.⁷¹ Somit stellt sich die Frage, ob die α,β -ungesättigte Carbonylstruktur für die antileishmanielle Aktivität unerlässlich ist. Es scheint deshalb sinnvoll weitere, in 2-Position substituierte Analoga des Paullon-Grundgerüsts zu entwickeln und den Einfluss dieser Substitution zu untersuchen.

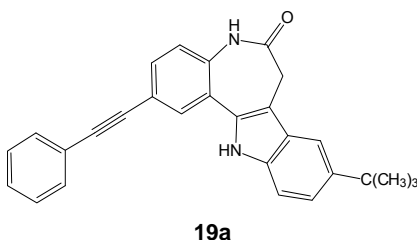


Abb. 1-19: Paullon-Derivat **19a** mit einem Phenylacetylsubstituenten in 2-Position⁷¹

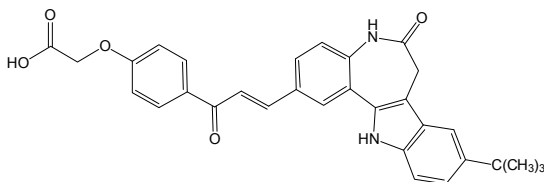
Tabelle 1-1: Antileishmanielle Aktivität und in vitro Toxizität der Paullone **16a**, **16b**, **17a-d** und **19a**^{§, 71}

Verbindung	GI ₅₀ AxA [*] [μM]	% Hemmung des Amastigotenwachstums in Makrophagen bei 5 μM	% Abtötung von THP-1-Makrophagen bei 5 μM
16a	3.1 ± 0.1	0	57.5 ± 2.5
16b	2.8 ± 0.2	56.2 ± 22.4	62.0 ± 3.0
17a	5.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
17b	0.78 ± 0.07	76.2 ± 21.0	0.0 ± 0.0
17c	0.84 ± 0.16	85.6 ± 8.1	0.0 ± 0.0
17d	1.1	93.8 ± 5.4	95.7 ± 1.3
19a	0.86 ± 0.54	72.0 ± 17.4	9.0

^{*}AxA – axenische Amastigoten; §. Mittelwerte ± SEM durch Doppel- oder Dreifachbestimmungen. Werte ohne Standardabweichungen stammen aus Einzelbestimmungen. SEM = Standardabweichung der Mittelwerte.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die antileishmanielle Substanzklasse der Paullon-Chalkon-Hybride **17** weiter entwickelt werden, um Verbindungen zu erhalten, die dann tatsächlich als Arzneistoffe in der Leishmaniose-Therapie eingesetzt werden könnten. Bei der Entwicklung neuer Verbindungen sollte eine verstärkte antileishmanielle Aktivität sowie geringe Toxizität erreicht werden. Um effektive Wirkstoffe zu entwickeln, bedarf es der Aufklärung der biologischen Zielstruktur. Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Wirkstoff und Target sind für die Optimierung neuer Wirkstoffe hilfreich. Die Identifizierung der biologischen Zielstruktur in den Leishmanien sollte mit Hilfe von Affinitätschromatographischen Untersuchungen mit immobilisiertem Wirkstoff erfolgen. Dazu sollte eine Verbindung synthetisiert werden, die sich für die Kupplung an feste Matrices eignet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Charles L. Jaffe plante mit diesen Matrices Affinitätschromatographische Studien mit Leishmanien-Homogenaten durchzuführen, um die Proteine zu identifizieren, die eine Affinität für den Wirkstoff aufweisen. In dieser Arbeit sollte speziell ein Wirkstoffderivat **20**, das über eine freie Carboxylgruppe verfügt, dargestellt werden. Diese Verbindung **20** sollte dann über EDC-Kupplung an einen aminogruppenhaltigen Agaroseträger gekuppelt werden.

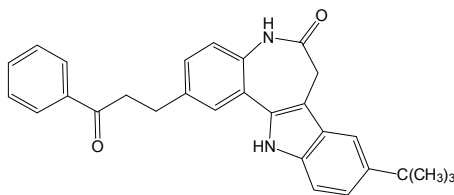


20

Abb. 2-1: Paullon-Chalkon-Hybrid **20** mit freier Carboxylgruppe

Es sollte untersucht werden, ob die Chalkon-Untereinheit der 2-(3-Aryl-3-oxoprop-1-en-1-yl)-9-*tert*-butylpaullone **17** für deren antiparasitäre Eigenschaften notwendig ist. Dieses elektrophile Strukturelement kann als Michael-Akzeptor-System mit Bionukleophilen reagieren. Eine derartige Eigenschaft ist bei Arzneistoffen nicht erwünscht, weil viele Wechselwirkungen mit anderen biologischen Strukturen im Organismus möglich sind. Da das bereits erwähnte Paullon-Derivat **19a**, das keine Enon-Teilstruktur besitzt, antileishmanielle Aktivität zeigte, ist es denkbar, dass auch

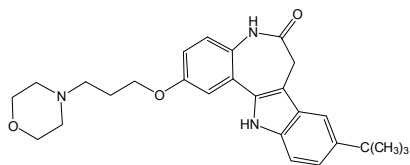
andere Verbindungen, bei denen dieses Strukturelement modifiziert ist, wirksam gegen Leishmanien sind. Gegenstand dieser Arbeit war die Synthese eines Dihydrochalkons **21**, bei dem die C,C-Doppelbindung selektiv reduziert ist. Die biologische Aktivität von **21** lässt dann auch Rückschlüsse über die Bedeutung des Michael-Akzeptor-Systems zu.



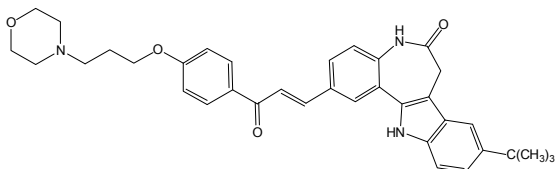
21

Abb. 2-2: Dihydrochalkon **21**

Die geringe Löslichkeit vieler Paullon-Chalkon-Hybride in Wasser kann zu Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Arzneiformen führen. Da die Substanzen für präklinische Untersuchungen und für die Anwendung als Arzneistoff in applizierbarer Form vorliegen müssen, ist dafür ein gewisser Grad an Wasserlöslichkeit nötig. Deshalb synthetisierte Reichwald auch Strukturen wie **22** und **23** mit ionisierbaren Seitenketten, um die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen zu verbessern. Allerdings waren **22** und **23** hinsichtlich ihres antileishmaniellen oder toxikologischen Profils nicht optimal. Deshalb sollten die Zimtsäureamide **24** und Zimtsäureanilide **25** dargestellt werden, in denen löslichkeitserhöhende Strukturen eingebunden sind. Diese Substanzen weisen ebenfalls keine Chalkon-Teilstruktur mehr auf.

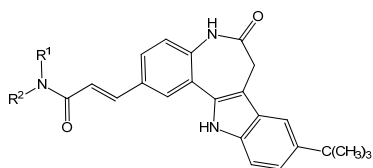


22

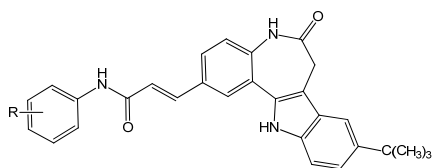


23

Abb. 2-3: Paullon-Derivate **22** und **23** mit ionisierbaren Seitenketten



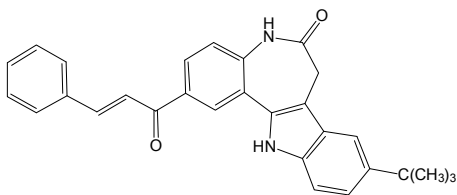
24



25

Abb. 2-4: Allgemeine Struktur der Zimtsäureamide **24** und Zimtsäureanilide **25**

Um weitere Erkenntnisse über den Einfluss der Enon-Teilstruktur zu erlangen, sollte die „Invertierung“ dieses Strukturelements untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit war dazu die Synthese der Zielstruktur **26** mit umgedrehter α,β -ungesättigter Carbonylstruktur vorgesehen.



26

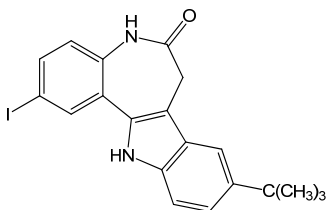
Abb. 2-5: Inverses Chalkon **26**

Proteinkinasen sind nicht nur bei Leishmanien ein interessantes Wirkstofftarget, sondern auch bei Trypanosomen.⁵⁸ Verwandte der Cyclin-abhängigen Kinasen, die CRKs (Cdc2-related protein kinase), wurden ebenfalls in *Trypanosoma brucei* identifiziert.⁷⁷ Untersuchungen dieser CRKs haben gezeigt, dass sie für die Regulation des Zellzyklus und das Wachstum der Trypanosomen von entscheidender Bedeutung sind.⁷⁸ Desweiteren wurde die Glykogen-Synthase-Kinase 3 in *T. brucei* als vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung trypanozider Wirkstoffe entdeckt.⁷⁹ In diesem Zusammenhang könnten Derivate der als Proteinkinase-Inhibitoren bekannten Paullone eventuell eine trypanozide Wirkung zeigen. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass Leishmanien und Trypanosomen als Angehörige der Trypanosomatidae-Familie gewisse genetische, metabolische und morphologische Ähnlichkeiten teilen, führten zu der Idee, die biologische Aktivität der neuen Verbindungen **21**, **24**, **25** und **26** auch an Trypanosomen zu testen.⁸⁰ Die entsprechenden Studien sollten von der Arbeitsgruppe von Prof. Charles L. Jaffe an *Trypanosoma brucei rhodesiense*-Parasiten (Blutform) durchgeführt werden.

3. Synthesen

3.1 Synthese der Edukte

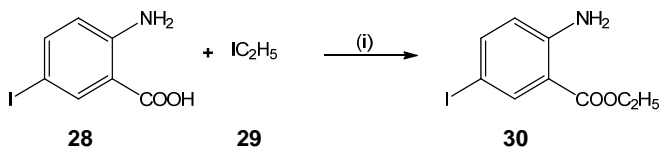
3.1.1 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (27)



27

In einer vierstufigen Synthese wurde das Zwischenprodukt 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-benzazepin-2,5-dion (**34**) ausgehend von 2-Amino-5-iodbenzoesäure (**28**) nach der von Kunick et al.⁸¹ beschriebenen und von Xie⁸² modifizierten Methode dargestellt.

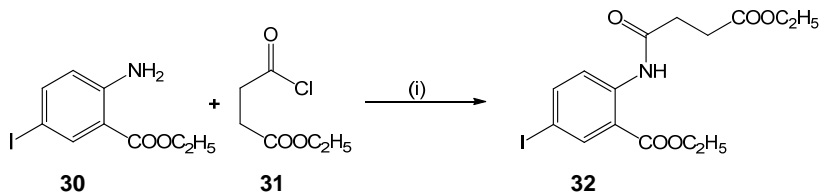
Veresterung der 2-Amino-5-iodbenzoesäure (**28**) mit Iodethan (**29**) in *N,N*-Dimethylformamid unter Zusatz von Kaliumcarbonat bei Raumtemperatur führte zum 2-Amino-5-iodbenzoesäureethylester (**30**) (Schema 3-1).



Schema 3-1: Darstellung von 2-Amino-5-iodbenzoesäureethylester (**30**);

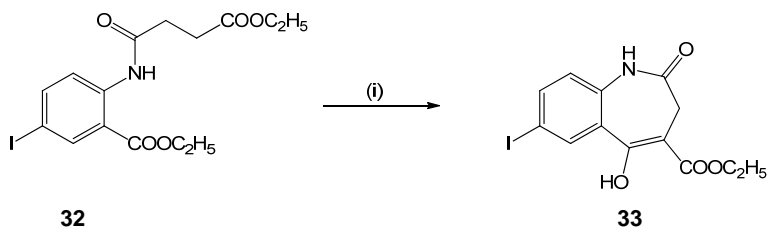
(i) K_2CO_3 , DMF, RT, 1-1.5 h, 58%.

Im nächsten Schritt erfolgte die Synthese des Amids **32** durch Acylierung der Aminogruppe des Esters **30** mit Bernsteinsäureethylesterchlorid (**31**) unter Zugabe der Hilfsbase Pyridin (Schema 3-2).



Schema 3-2: Synthese von 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**32**); (i) Pyridin, Toluol, 80 °C, 2 h, 90%.

Der Ringschluss zum 5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**33**) gelang durch eine Dieckmann-Ester-Kondensation unter Erhitzen von **32** in DMF/Toluol mit Kaliumhydrid bei 80 °C (Schema 3-3).

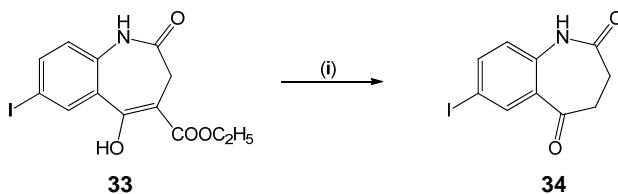


Schema 3-3: Ringschluss zum 5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**33**); (i) KH, DMF, Toluol, N₂, 80 °C, 2 h, 84%.

Kaliumhydrid ist sehr reaktiv und entzündet sich bei Kontakt mit Feuchtigkeit. Infolgedessen erfordert das Arbeiten mit Kaliumhydrid besondere Sicherheitsvorkehrungen. Ein weiterer Nachteil ist, dass man das in Mineralöl suspendierte Kaliumhydrid mit getrocknetem Toluol waschen muss. Mit dem Ziel, das Gefährdungspotential zu reduzieren und die Anwendung zu vereinfachen, wurde das Kaliumhydrid äquimolar gegen Kalium-*tert*-butoxid unter Beibehaltung der Reaktionsbedingungen ausgetauscht. Kalium-*tert*-butoxid lässt sich als Pulver leichter handhaben, wodurch genaueres und einfacheres Abwiegen möglich wird. Leider führte der Einsatz von Kalium-*tert*-butoxid bei Reaktionsansätzen in der Größenordnung von etwa 20 mmol zu geringeren Ausbeuten. Da es sich bei **33** um ein Zwischenprodukt einer

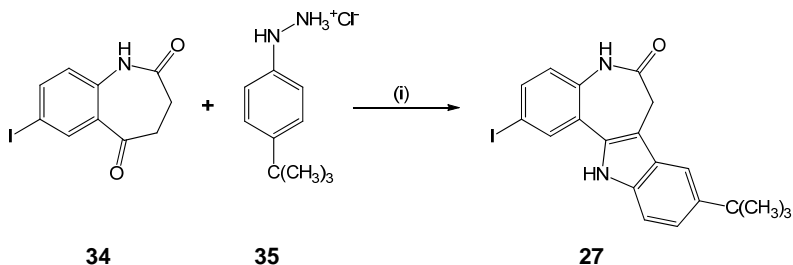
mehrstufigen Synthese handelt, war dieser Umstand besonders wichtig und Kalium-*tert*-butoxid wurde zukünftig nicht mehr verwendet.

Erhitzen von **33** in wasserhaltigem DMSO führte durch die von Kunick⁸³ beschriebene Dealkoxycarbonylierung zum gewünschten Produkt **34** (Schema 3-4).



Schema 3-4: Dealkoxycarbonylierung zum 7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**34**); (i) DMSO, H₂O, N₂, 150 °C, 4 h, 77%.

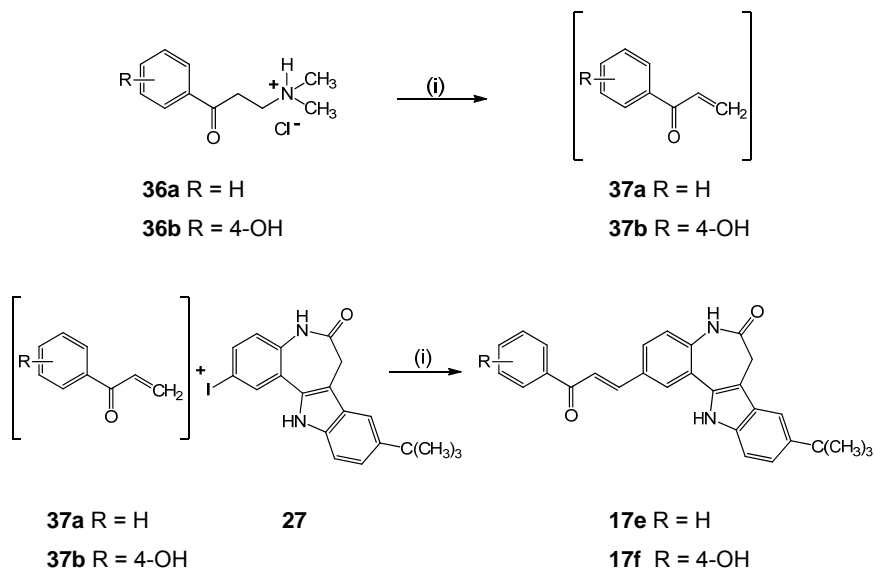
Gemäß der Vorschrift nach Kunick⁸⁴ wurde die Verbindung **34** mit 1-(4-*tert*-Butylphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**35**) in Eisessig zum 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**) umgesetzt (Schema 3-5). Das während der Reaktion gebildete Phenylhydrazon wurde nicht isoliert, sondern durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure in einer Säure-katalysierten Fischer-Indol-Synthese zum Intermediat **27** zyklisiert. Natriumacetat dient der Freisetzung der freien Base aus dem Phenylhydrazinhydrochlorid **35**. Diese Reaktion wurde im Parallelsynthesereaktor durchgeführt, der es ermöglicht, mehrere Ansätze gleichzeitig herzustellen.



Schema 3-5: Synthese des 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullons (**27**); (i) 1. AcOH, NaOAc, 85 °C, 1 h; 2. konz. H₂SO₄, 85 °C, 1 h, 62%.

3.1.2 Synthese der 2-[(1*E*)-3-Aryl-3-oxoprop-1-en-1-yl]paullone **17e** und **17f**

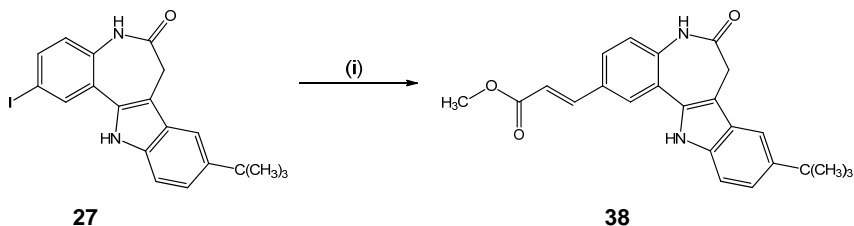
Die von Reichwald⁶⁹ entwickelte Variante der Heck-Reaktion⁸⁵ wurde zur Darstellung der 2-[(1*E*)-3-Aryl-3-oxoprop-1-en-1-yl]paullone **17e** und **17f** angewandt. Das 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullon (**27**) und das Hydrochlorid der entsprechenden Mannich-Base **36a** bzw. **36b** wurden unter Zusatz von Palladium(II)acetat und Triethylamin in DMF suspendiert und 30 Minuten bei 140 °C im Parallelsynthesereaktor gerührt. Beim Erhitzen entsteht aus der Mannich-Base **36a** bzw. **b** ein terminales Alken **37a** bzw. **b**, welches unter den gewählten Reaktionsbedingungen mit **27** in einer Heck-Reaktion zum 2-[(1*E*)-3-Aryl-3-oxoprop-1-en-1-yl]paullon **17e** bzw. **17f** reagiert (Schema 3-6).



Schema 3-6: Synthese der 2-[(1*E*)-3-Aryl-3-oxoprop-2-en-1-yl]paullone **17e** und **17f**; (i) Pd(OAc)₂, Et₃N, DMF, 140 °C, 1-1.5 h, 55% (**17e**), 54% (**17f**).

3.1.3 Synthese von (2*E*)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*]-[1]benzazepin-2-yl)acrylsäuremethylester (**38**)

Für die Darstellung der Paullon-Zimtsäureamid-Derivate **24** und **25** (siehe 3.5) war zunächst die Umsetzung des Esters **38** mit entsprechenden Aminen geplant. Für die Herstellung von **38** wurden nach der Vorschrift von Reichwald⁶⁹ das 9-*tert*-Butyl-iodpaullon (**27**), Acrylsäuremethylester, Palladium(II)acetat und Triethylamin in DMF unter Stickstoffbegasung bei 150 °C erhitzt (Schema 3-7).



Schema 3-7: Darstellung des Esters **38**; (i) Acrylsäuremethylester, Pd(OAc)₂, Et₃N, DMF, N₂, 150 °C, 30 min, 44%.

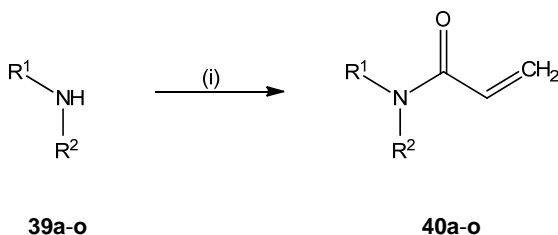
3.1.4 Synthese der Acrylamide **40a-o**

Die Acrylamide **40a-j** wurden nach der von Eriksson et al.⁸⁶ beschriebenen Methode dargestellt und in mäßigen bis sehr guten Rohausbeuten erhalten. Hierbei wurde das jeweilige Amin **39a-j** in einer Wasser/Aceton-Mischung in Gegenwart von Kaliumcarbonat tropfenweise unter Eiskühlung mit Acrylsäurechlorid versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (Schema 3-8).

Für die Darstellung von 1-Acryloyl-4-methylpiperazin (**40k**) wurde die Vorschrift der Arbeitsgruppe von Le Sann et al.⁸⁷ angewandt. Dazu wurde Acrylsäurechlorid zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung desamins **39k** in Dichlormethan getropft. Der Reaktionsansatz wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Edukts **39k** bei 0 °C gerührt (Schema 3-8).

Nach Kuhnert et al.⁸⁸ wurden die Acrylamide **40l** und **40m** in guten Rohausbeuten erhalten. Bei Raumtemperatur wurde Acrylsäurechlorid zu einer Lösung aus Benzylamin (**39l**) bzw. Diethylamin (**39m**) in Dichlormethan und Triethylamin zugetropft (Schema 3-8).

Die von Agüero et al.⁸⁹ beschriebene Methode wurde für die Synthese von *N*-(Pyridin-3-ylmethyl)acrylamid (**40n**) und *N*-(Pyridin-2-ylmethyl)acrylamid (**40o**) in modifizierter Weise durchgeführt und lieferte geringe bis mäßige Rohausbeuten. Zu einer Lösung aus Acrylsäurechlorid und Dichlormethan wurde eine Mischung aus 2-(Aminomethyl)pyridin (**39o**) bzw. 3-(Aminomethyl)pyridin (**39n**) und Triethylamin in Dichlormethan bei -10 °C tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur über Nacht gerührt (Schema 3-8).



Schema 3-8: Darstellung der Acrylamide **40a-j** nach Eriksson et al.⁸⁶:

(i) Acrylsäurechlorid, K₂CO₃, Aceton, Wasser, < 5 °C → RT, 16.5-26 h, 27-92% (Rohausbeute).

Synthetisiertes Acrylamid **40k** nach Le Sann et al.⁸⁷:

(i) Acrylsäurechlorid, CH₂Cl₂, 0 °C, 2-3 h, 15-64% (Rohausbeute).

Dargestellte Acrylamide **40l** und **40m** gemäß Kuhnert et al.⁸⁸:

(i) Acrylsäurechlorid, CH₂Cl₂, Et₃N, RT, 23-24 h, 60-74% (Rohausbeute).

Nach Agüero et al.⁸⁹ synthetisierte Acrylamide **40n** und **40o**:

(i) Acrylsäurechlorid, CH₂Cl₂, Et₃N, -10 °C → RT, 23-25 h, 10-40% (Rohausbeute).

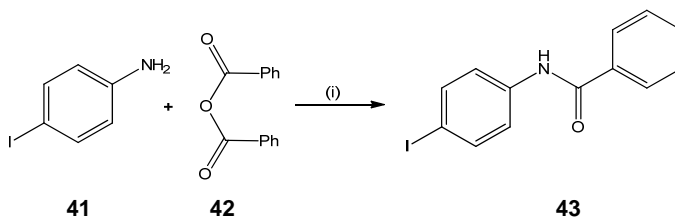
Tabelle 3-1: Synthetisierte Acrylamide **40a-o**

39/40	R¹	R²	39/40	R¹	R²
a	$-(\text{CH}_2)_5-$		i	$4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2-$	H
b	C_6H_5-	H	j	$2\text{-F-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2-$	H
c	$3\text{-Cl-C}_6\text{H}_4-$	H	k	$-(\text{CH}_2)_2\text{-N(CH}_3\text{)-}(\text{CH}_2)_2-$	
d	$4\text{-Cl-C}_6\text{H}_4-$	H	l	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2-$	H
e	$4\text{-H}_3\text{C-C}_6\text{H}_4-$	H	m	$\text{H}_3\text{C-CH}_2-$	$\text{H}_3\text{C-CH}_2-$
f	$4\text{-H}_3\text{CO-C}_6\text{H}_4-$	H	n	Pyridin-3-ylmethyl	H
g	$4\text{-H}_3\text{C-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2-$	H	o	Pyridin-2-ylmethyl	H
h	$4\text{-H}_3\text{CO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2-$	H			

3.2 Synthese von *N*-{4-[(1*E*)-3-Oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]phenyl}benzamid (**44**) als Modellschubstanz für die selektive Reduktion der C,C-Doppelbindung der Chalkon-Teilstruktur

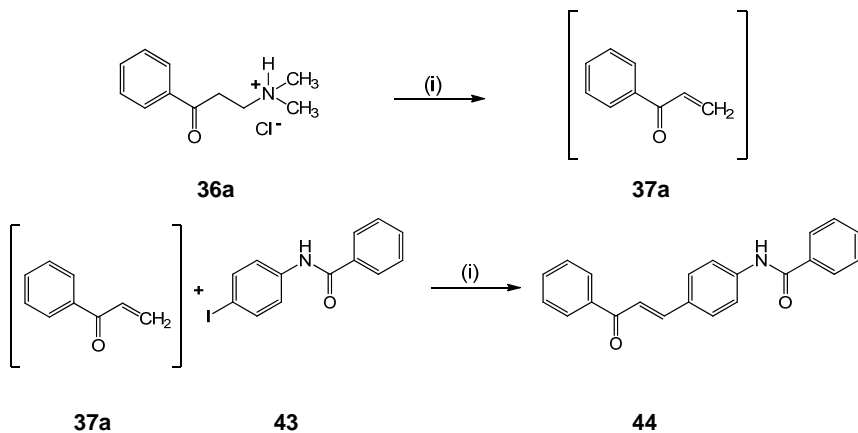
Ein wichtiges Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Synthese des Dihydrochalkons **21**, das durch Reduktion der entsprechenden ungesättigten Verbindung **17e** erhalten werden sollte. Um den Verbrauch der wertvollen Ausgangsverbindung **17e** zu vermeiden, sollte die Methodik der Reduktion zunächst an der Modellschubstanz **44** erprobt werden. Da das Chalkon **44** eine para-ständige Benzoylamino-Gruppe besitzt, kann man für diese Verbindung ähnliche elektronische Eigenschaften erwarten wie für das Paullon-Chalkon-Hybrid **17e**. Die Modellschubstanz **44** wurde in einer zweistufigen Synthese dargestellt.

Im ersten Schritt wurde nach einer Vorschrift von Björnstedt et al.⁹⁰ das Zwischenprodukt **43** durch Benzoylierung von 4-Iodanilin (**41**) mit Benzoesäureanhydrid (**42**) in Dichlormethan unter Einwirkung von Triethylamin erhalten (Schema 3-9).



Schema 3-9: Synthese von *N*-(4-Iodphenyl)benzamid (**43**) nach Björnstedt et al.⁹⁰,
(i) CH₂Cl₂, Et₃N, Reflux, 4 h, 87%.

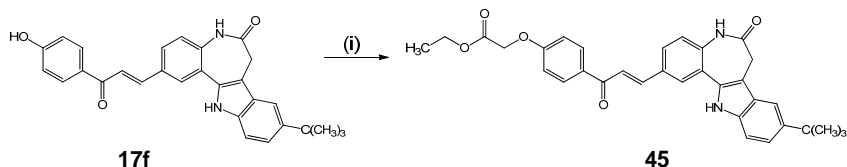
Anschließend wurde **43** mit *N,N*-Dimethyl-3-oxo-3-phenyl-1-propanaminiumchlorid (**36a**) durch die modifizierte Heck-Reaktion⁶⁹ zu *N*-{4-[(1*E*)-3-Oxo-3-phenyl-prop-1-en-1-yl]phenyl}benzamid (**44**) umgesetzt (Schema 3-10).



Schema 3-10: Heck-Reaktion von *N*-(4-Iodphenyl)benzamid (**43**) mit der Keton-Mannichbase **36a**; (i) Pd(OAc)₂, Et₃N, DMF, 140 °C, 1-2 h, 45%.

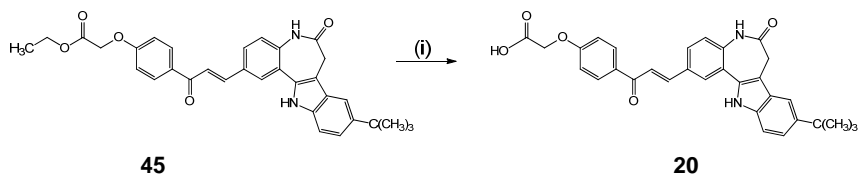
3.3 Synthese von {4-[(2*E*)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)prop-2-enoyl]phenoxy}essigsäure (**20**)

Ausgehend von dem Paullon-Chalkon-Hybrid **17f** wurde die Zielstruktur **20** in einer zweistufigen Synthese gewonnen. Die Veretherung des Phenols **17f** erfolgte nach der Herstellungsvorschrift von Lévai et al. und konnte in mittlerer Ausbeute realisiert werden.⁹¹ Bei der Durchführung wurde Bromessigsäureethylester anstatt des vorgeschriebenen Chloressigsäureethylesters eingesetzt. Die Ausgangsverbindung **17f** wurde mit Bromessigsäureethylester in Aceton in Gegenwart von Kaliumcarbonat mehrere Stunden refluxiert (Schema 3-11).



Schema 3-11: Umsetzung des Phenols **17f** zum Ester **45**; (i) Bromessigsäureethylester, K₂CO₃, Aceton, Reflux, 2.5 h, 57%.

Theodorou et al.⁹² haben ein einfaches, schnelles und mildes Verfahren entwickelt, Ester im nicht-wässrigen Milieu alkalisch zu hydrolysieren. Sie beobachteten, dass der Einsatz des aprotischen Lösungsmittels Dichlormethan die Reaktion beschleunigte und die Aufarbeitung des Produktes erleichterte. Anlehnend an diese Methode wurde der Ester **45** unter Zugabe von methanolischer Natriumhydroxid-Lösung (1 Mol/L) in einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol (9:1) bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das gewünschte Produkt **20** nach Ansäuern mit 10%iger Salzsäure in guter Ausbeute erhalten (Schema 3-12).



Schema 3-12: Alkalische Hydrolyse des Esters **45** nach Theodorou et al.⁹²,

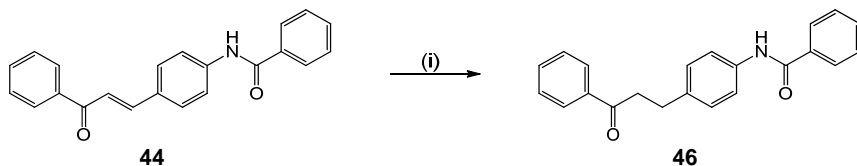
- (i) 1. CH₂Cl₂, CH₃OH, methanol. NaOH (1 Mol/L), RT, 40 min; 2. 10%ige Salzsäure, 79%.

3.4 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**21**)

Um die Zielverbindung **21** zu gewinnen, musste eine Methode gewählt werden, die eine chemoselektive Reduktion der C,C-Doppelbindung der Enonstruktur gewährleistet, denn auch die Keto- bzw. Lactam-Funktion des Chalkons **17e** können durch Reduktionsmittel angegriffen werden. In der Literatur werden verschiedene Synthesewege zur selektiven Reduktion der C,C-Doppelbindung beschrieben, wie z. B. Reduktion mit Nickelborid in Methanol/Wasser⁹³, Magnesium/Zinkchlorid in wässrigen Medien⁹⁴, Zink in konz. Essigsäure⁹⁵ und viele weitere Methoden. Um eine Verschwendung der Ausgangssubstanz **17e** zu vermeiden, wurden die Versuche zur Reduktion der Doppelbindung zuerst an der Modellschubstanz **44** erprobt.

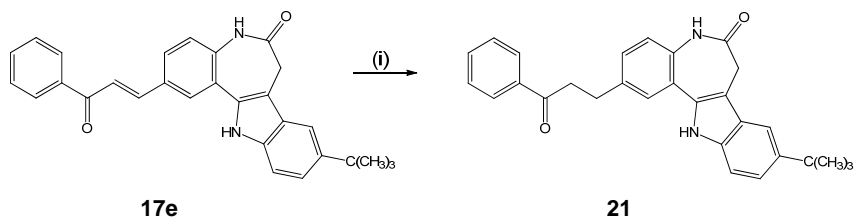
Die von Khurana und Sharma⁹³ beschriebene Methode, die unter Einsatz von Nickelborid in Gegenwart von Methanol/Wasser zum reduzierten Produkt führen soll, war nicht erfolgreich. Zhang et al.⁹⁵ synthetisierten Dihydrochalkone, indem sie die entsprechenden Chalkone einer Reduktion mit Zinkstaub in Essigsäure im Ultraschallbad unterzogen. Unter diesen Bedingungen wurde die C,C-Doppelbindung des α,β -ungesättigten Ketons selektiv reduziert, auch in Gegenwart von anderen reduzierbaren funktionellen Gruppen wie isolierten Doppelbindungen oder aromatischen Halogeniden. Kurze Reaktionszeiten, einfache Durchführbarkeit, milde Reaktionsbedingungen sowie kostengünstige Reagenzien sind weitere Vorteile dieser Methodik.

Zunächst wurde diese Herstellungsvorschrift an der Modells substanz **44** getestet (Schema 3-13). Bereits nach 10 Minuten war kein Edukt **44** mehr dünnschichtchromatographisch nachweisbar. Mit Hilfe der NMR-Spektrometrie wurde die Struktur dieser Verbindung identifiziert. Im ^1H -NMR-Spektrum der Ausgangsverbindung **44** treten die Protonen an der Doppelbindung als Dubletts mit großen Kopplungskonstanten ($J = 15.6 \text{ Hz}$) auf. Die Größenordnung der Kopplungskonstanten zeigt, dass die beiden Protonen (*E*)-konfiguriert vorlagen. Im ^1H -NMR-Spektrum der gewonnenen Substanz **46** fehlten diese Signale, stattdessen trat ein Triplett bei 2.93 ppm für eine CH_2 -Gruppe auf. Das Triplett der benachbarten CH_2 -Gruppe wurde offensichtlich teilweise vom H_2O -Signal überlagert. Im ^{13}C -NMR-Spektrum lagen bei 39.4 ppm und 28.9 ppm jeweils Signale für die sekundären Kohlenstoffatome der beiden CH_2 -Gruppen vor. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass es sich bei der isolierten Substanz um das gewünschte Dihydrochalkon **46** handelte. Weitere analytische Untersuchungen zur Charakterisierung der Verbindung **46** wurden nicht durchgeführt.



Schema 3-13: Reduktion des Chalkons **44** zum Dihydrochalkon **46** nach Zhang et al.⁹⁵; (i) Zinkstaub, HOAc, Ultraschallbad, RT, 10 min, 8%.

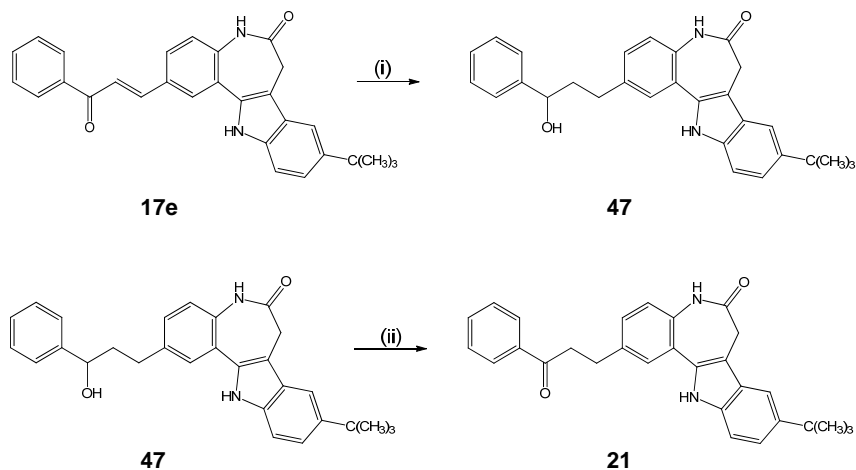
Anschließend wurde das 2-[(1*E*)-3-Phenyl-3-oxoprop-1-en-1-yl]paullon **17e** der Reduktion mit Zinkstaub und Essigsäure bei Raumtemperatur im Ultraschallbad unterworfen (Schema 3-14). Bei größeren Ansätzen wurde die Reduktion auch ohne Beschallung getestet. Die Bildung des Dihydrochalkons **21** konnte unter beiden Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden. Die DC-Kontrolle zeigte, dass sich während der Reaktion mehrere Produkte bildeten. Aus dem Produktgemisch konnte die Zielverbindung **21** durch Säulenchromatographie mit einer geringen Ausbeute isoliert werden.



Schema 3-14: Synthese des Dihydrochalkons **21**; (i) Zinkstaub, HOAc, RT, 4 h, 14%.

3.4.1 Weitere Versuche zur Darstellung von 9-*tert*-Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**21**)

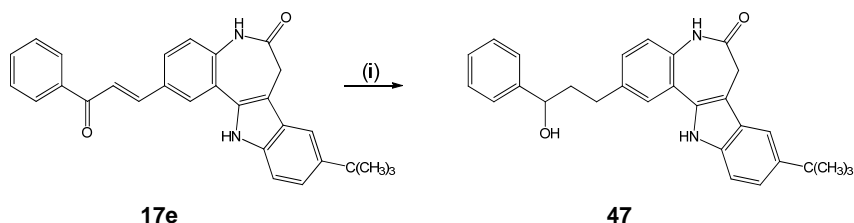
Für die Darstellung des Dihydrochalkons **21** war auch eine alternative Synthesesequenz geplant. Bei dieser sollte zunächst eine Reduktion mit Magnesium-Spänen in Methanol den Alkohol **47** liefern, der im zweiten Schritt zum Keton **21** oxidiert werden sollte (Schema 3-15).



Schema 3-15: Geplante Synthese des Dihydrochalkons **21**; (i) Magnesium-Späne, CH₃OH, RT; (ii) CrO₃, H₂SO₄, H₂O, Aceton, 0 °C → RT.

3.4.2 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**47**)

Anlehnend an die Vorschrift von Schultz⁹⁶ wurde der Alkohol **47** mit einer guten Rohausbeute erhalten, indem das Chalkon **17e** mit Magnesium-Spänen in Methanol bei Raumtemperatur über Nacht gerührt wurde (Schema 3-16). Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 10%iger Salzsäure neutralisiert und der Alkohol **47** mit Ethylacetat extrahiert.



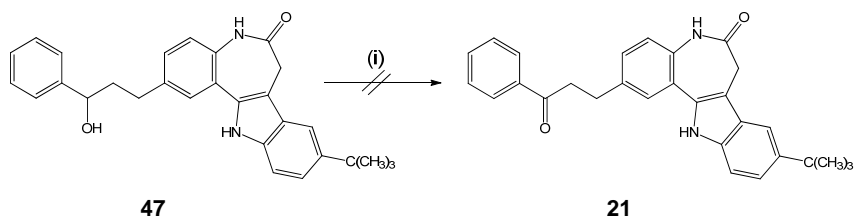
Schema 3-16: Reduktion des Chalkons **17e** zum Alkohol **47**; (i) Magnesium-Späne, CH₃OH, RT, 24 h, 89% (Rohausbeute).

Das ¹H-NMR-Spektrum des gewonnenen Produkts bestätigte, dass bei dieser Reaktion sowohl die Carbonylfunktion als auch die Doppelbindung des Edukts **17e** reduziert wurde. Durch Aufnahme eines ¹H-NMR-Spektrums nach D₂O-Zugabe konnte das OH-Proton detektiert werden. Der Alkohol **47** wurde ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Oxidation eingesetzt.

3.4.3 Versuch zur Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**21**)

Nach der Synthesevorschrift von Hunter et al.⁹⁷ wurde versucht den sekundären Alkohol **47** durch eine Jones-Oxidation⁹⁸ in das Keton **21** zu überführen (Schema 3-17). Dabei entstanden jedoch zwei Produkte, die sich säulenchromatographisch nicht trennen ließen. Da mit der Zinkstaub-Reduktion nach Zhang⁹⁵ (s. oben) inzwischen eine alternative Methode identifiziert worden war, die nur einen Reaktionsschritt

erfordert, wurde die Sequenz Mg-Reduktion/Jones-Oxidation zur Darstellung von **21** nicht weiter verfolgt.



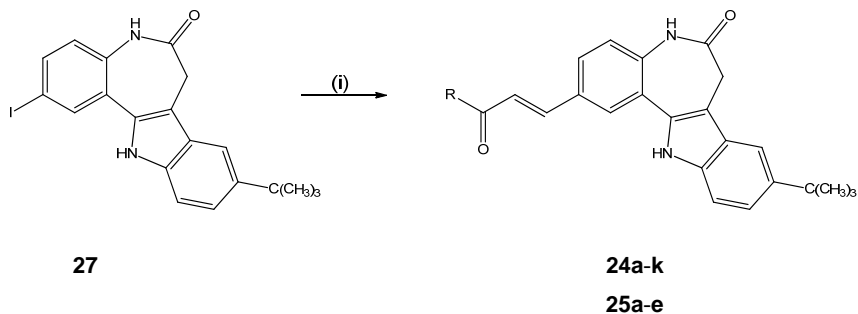
Schema 3-17: Versuch der Jones-Oxidation mit **47**; (i) CrO_3 , H_2SO_4 , H_2O , Aceton, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$.

3.5 Synthese der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e**

Die Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** sollten zunächst durch eine Reaktion des Esters **38** mit den jeweiligen Aminen bzw. Anilinen gewonnen werden. Der Versuch, die Verbindungen **24b** durch Erhitzen des Esters **38** mit Piperidin (**39a**) zu erhalten, gelang jedoch nicht. Daher entstand die Idee, die gewünschte Seitenkette in 2-Position des 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullons (**27**) mit Hilfe der Heck-Reaktion einzuführen. Bei der Heck-Reaktion handelt es sich um etablierte Methode zur C-C-Bindungsknüpfung. Es ist eine Palladium-katalysierte Reaktion, die in Anwesenheit einer geeigneten Base zu einer Arylierung bzw. Alkylierung von Alkenen führt.⁸⁵

Für die Synthese der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** wurde das 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullon (**27**) und das jeweilige Acrylamid **40a-o** bzw. 4-Acryloylmorpholin in DMF gelöst. Nach Zugabe des Katalysators Palladium(II)acetat und der Base Triethylamin wurde der Reaktionsansatz unter Stickstoffbegasung auf 150°C erhitzt (Schema 3-18). Konnte ein Nebenprodukt dünnschichtchromatographisch am Startfleck detektiert werden, so wurde dieses mit Hilfe einer mit Kieselgel gefüllten Fritte abgetrennt. Die Isolierung der gewünschten Produkte erfolgte durch säulenchromatographische Reinigung und/oder Umkristallisieren

in einem geeigneten Lösemittel. Die Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** konnten mit geringen bis mittleren Ausbeuten (5-59%) gewonnen werden.



Schema 3-18: Darstellung der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** durch Heck-Reaktion; (i) Acrylamid **40a-o** bzw. 4-Acryloylmorpholin, Pd(OAc)₂, Et₃N, DMF, N₂, 150 °C, 30 min - 170 min, 5-59%.

Im ¹H-NMR-Spektrum der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** zeigen die Dubletts der Protonen an der Doppelbindung große Kopplungskonstanten ($J = 15\text{-}16\text{ Hz}$), die auf eine *trans*-Konfiguration dieser Verbindungen hinweisen.

Tabelle 3-2: Synthetisierte Zimtsäureamide **24a-k**

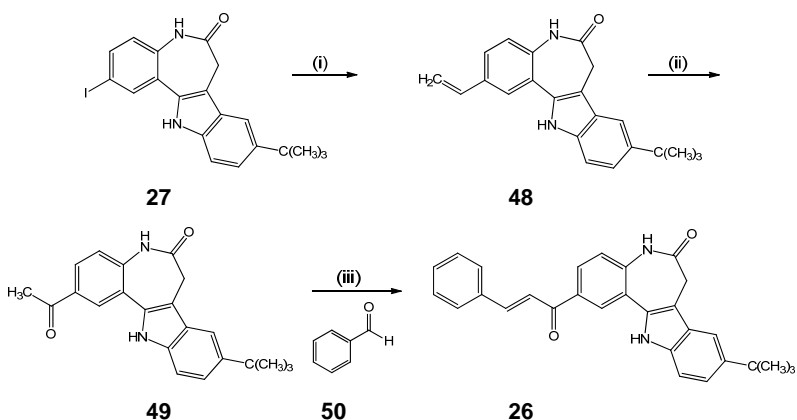
24	R	24	R
a	Morpholin-4-yl	g	4-H ₃ CO-Benzyl-NH-
b	Piperidin-1-yl	h	4-Cl-Benzyl-NH-
c	(C ₂ H ₅) ₂ N-	i	2-F-Benzyl-NH-
d	Benzyl-NH-	j	Pyridin-3-ylmethyl-NH-
e	4-Methylpiperazin-1-yl	k	Pyridin-2-ylmethyl-NH-
f	4-H ₃ C-Benzyl-NH-		

Tabelle 3-3: Synthetisierte Zimtsäureanilide **25a-e**

25	R	25	R
a	Ph-NH-	d	4-H ₃ C-Ph-NH-
b	3-Cl-Ph-NH-	e	4-H ₃ CO-Ph-NH-
c	4-Cl-Ph-NH-		

3.6 Synthesesequenz für die Darstellung von 9-*tert*-Butyl-2-[(*E*)-3-phenylprop-2-enoyl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**26**)

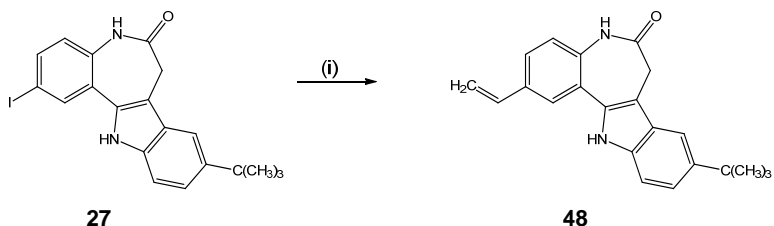
Für die Darstellung des inversen Chalkons **26** war folgende dreistufige Syntheseroute geplant: zunächst sollte 9-*tert*-Butyl-2-iodpauillon (**27**) in einer Stille-Kupplung zur 2-Vinylverbindung **48** umgesetzt werden.⁸² Anschließend sollte durch eine Wacker-Oxidation das 2-Acetylderivat **49** dargestellt werden.⁹⁹ Im letzten Schritt sollte das Zwischenprodukt **49** in einer klassischen Claisen-Schmidt-Reaktion mit Benzaldehyd (**50**) zur Zielstruktur **26** umgewandelt werden (Schema 3-19).¹⁰⁰



Schema 3-19: Geplante Synthese des inversen Chalkons **26**; (i) Tributylvinylzinn, PdCl₂(PPh₃)₂, 2,6-Di-*tert*-4-methylphenol, DMF, N₂, 60-70 °C; (ii) PdCl₂, CuCl₂, DMF, H₂O, RT; (iii) KOH, EtOH, 0 °C → RT.

3.6.1 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-vinyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**48**)

Anlehnend an die Arbeitsvorschrift von Xie et al.⁸² wurde die 2-Vinylverbindung **48** aus dem Edukt **27** unter Verwendung von Tributylvinylzinn und dem Katalysator Bis(triphenylphosphin)palladium(II)chlorid in einer Stille-Kupplung mit mäßiger Ausbeute hergestellt (Schema 3-20). Die Stille-Reaktion¹⁰¹ ist eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung, die zur C-C-Verknüpfung zwischen Stannanen (Organozinnverbindungen) und organischen Halogeniden oder Triflaten angewendet wird. Sie zeichnet sich durch eine hohe Selektivität und breite Anwendbarkeit aus. Nachteilig ist jedoch der Einsatz toxischer Organozinn-Reagenzien.

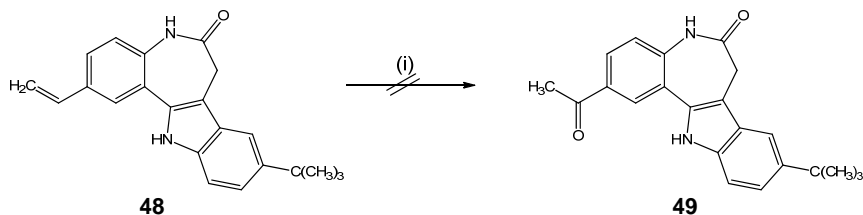


Schema 3-20: Stille-Kupplung von 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullon (**27**) mit Tributylvinylzinn; (i) Tributylvinylzinn, PdCl₂(PPh₃)₂, 2,6-Di-*tert*-4-methylphenol, DMF, N₂, 60-70 °C, 45 min, 31%.

Laut dünnschichtchromatographischer Reaktionskontrolle konnte nach 30 Minuten kein Edukt mehr detektiert werden. Das Entstehen der Zielverbindung **48** konnte auf der DC-Platte anhand der Baeyerschen Probe gezeigt werden. Bei diesem Test können durch Oxidation mit Kaliumpermanganat Doppelbindungen im Molekül nachgewiesen werden. Beim Betupfen des Produktfleckes mit verdünnter Kaliumpermanganat-Lösung wurde diese sofort entfärbt. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und der Katalysator-Reste wurde die säulenchromatographische Reinigung gewählt.

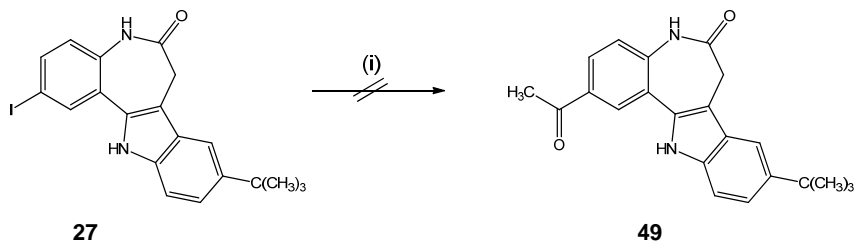
3.6.2 Versuche zur Darstellung von 2-Acetyl-9-*tert*-butyl-7,12-dihydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**49**)

Nach der Synthesevorschrift von Kunick et al.⁹⁹ sollte versucht werden, die 2-Vinylverbindung **48** durch eine Wacker-Oxidation in das 2-Acetylpaullon **49** umzuwandeln. Dazu wurde das terminale Olefin **48** in wässrigem DMF mit CuCl₂ und PdCl₂ bei Raumtemperatur gerührt (Schema 3-21). Da nach 20 Stunden laut DC-Kontrolle keine Produktbildung stattfand, wurde der Reaktionsansatz auf 160 °C erhitzt. Während des Erhitzens entstanden zwei Produkte. Der Versuch, diese durch säulenchromatographische Auftrennung zu isolieren, gelang nicht.



Schema 3-21: Versuch der Wacker-Oxidation mit dem 2-Vinylpaullon **48**;
(i) PdCl₂, CuCl₂, DMF, H₂O, RT.

Eine weitere Alternative das gewünschte Zwischenprodukt **49** darzustellen, war die Herstellungsverfahren der Arbeitsgruppe Cacchi et al.¹⁰² Sie berichten von einer Methode, bei der man aus Aryliodiden mit Essigsäureanhydrid Palladium-katalysiert Acetophenonderivate herstellen kann. Die Anwendung dieser Methode hätte den Vorteil, dass das 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullon (**27**) ohne den Zwischenschritt der Stille-Kupplung direkt in das 2-Acetylpaullon **49** umgewandelt werden könnte. Daher wurden 9-*tert*-Butyl-2-iodpaullon (**27**), Essigsäureanhydrid und Lithiumchlorid in Gegenwart der Base Ethyldiisopropylamin und des Katalysators Tris-(dibenzylidenaceton)dipalladium in DMF bei 100 °C unter Stickstoffbegasung erhitzt (Schema 3-22).

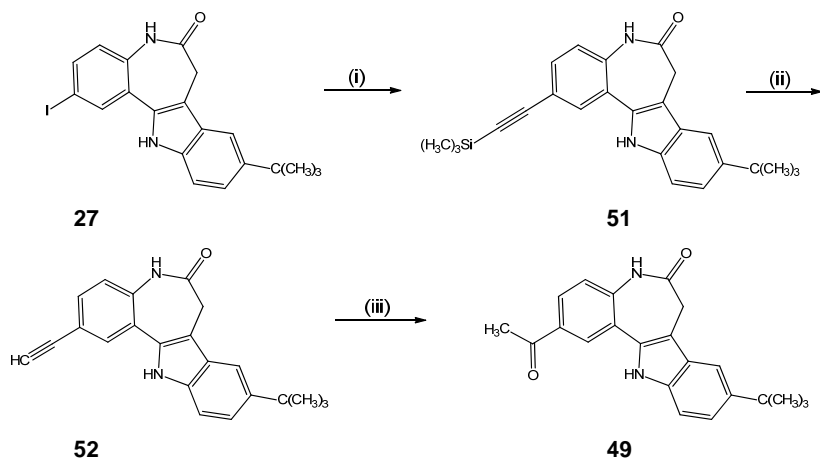


Schema 3-22: Syntheseversuch zur Darstellung von 2-Acetylpaullon **49**;

(i) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{EtN}(\text{i-Pr})_2$, LiCl , DMF , N_2 , DMF .

Nach achttündigem Erhitzen bei 100 °C zeigte die DC-Kontrolle, dass das Edukt **27** sowie drei Produkte im Reaktionsansatz vorhanden waren. Nach weiteren acht Stunden bei 150 °C war das 9-*tert*-Butyl-2-iodopaullon (**27**) nicht mehr auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar. Die Isolierung der Produkte mittels Säulenchromatographie blieb erfolglos.

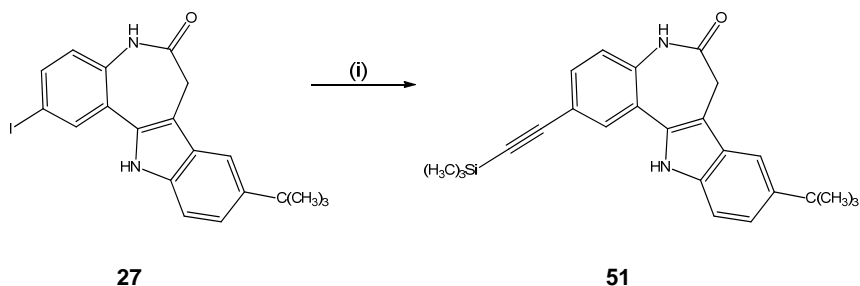
Da die Darstellung von **49** nach den oben genannten Verfahren nicht gelang, wurde eine alternative dreistufige Syntheseroute für die 2-Acetylverbindung **49** entwickelt. Im ersten Schritt wird das 9-*tert*-Butyl-2-iodopaullon (**27**) in einer Sonogashira-Reaktion mit Trimethylsilylacetylen in das Zwischenprodukt **51** überführt.¹⁰³ Nach Desilylierung¹⁰³ von **51** zur 2-Ethynylverbindung **52** und anschließender Alkinhydratisierung nach Kucherov erhält man die 2-Acetylverbindung **49**.¹⁰⁴ Schema 3-23 zeigt die Synthesesequenz für **49**.



Schema 3-23: Synthesesequenz des 2-Acetylpaullons **49**; (i) Trimethylsilylacetylen, CuI, PdCl₂(PPh₃)₂, Et₃N, DMF, N₂, 50 °C; (ii) N(C₄H₉)₄F x 3 H₂O, THF, N₂, RT; (iii) Hg(OAc)₂, H₂SO₄, Aceton, H₂O, Reflux.

3.6.3 Synthese von 9-tert-Butyl-2-[(trimethylsilyl)ethinyl]-7,12-dihydroindolo-[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**51**)

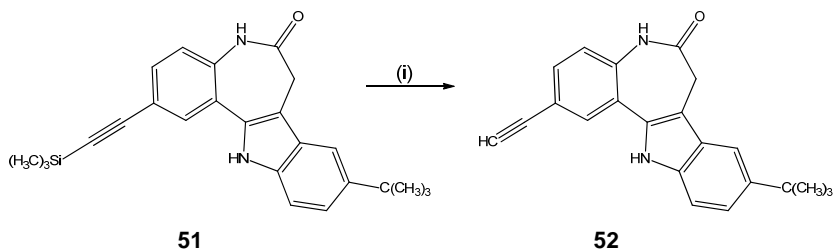
Zur Darstellung der Verbindung **51** wurde die Sonogashira-Reaktion angewandt. Diese Reaktion ermöglicht die Kupplung von Aryl- und Alkenylhalogeniden und -triflaten mit endständigen Alkinen unter Palladium-Kupfer-Katalyse in Anwesenheit einer Base. Die von Dunkel¹⁰³ beschriebenen Reaktionsbedingungen kamen bei der Umsetzung des 9-tert-Butyl-2-iodopaullons (**27**) zur Anwendung und lieferten das Produkt **51** in mittlerer Rohausbeute. Da sich das Edukt **27** in der Base Triethylamin nicht ausreichend löste, wurde *N,N*-Dimethylformamid zur Löslichkeitsverbesserung zugesetzt. Eine Lösung aus 9-tert-Butyl-2-iodopaullon (**27**), Bis(triphenylphosphin)-palladium(II)dichlorid, Triethylamin und Kupfer(I)iodid wurde bei 50 °C unter Stickstoff gerührt. Trimethylsilylacetylen wurde unter langsamem Zutropfen dem Reaktionsansatz zugefügt (Schema 3-24).



Schema 3-24: Sonogashira-Kupplung von 9-*tert*-Butyl-2-iodpallone (**27**) mit Trimethylsilylacetylen; (i) Trimethylsilylacetylen, CuI, PdCl₂(PPh₃)₂, Et₃N, DMF, N₂, 50 °C, 40-60 min, 55% (Rohausbeute).

3.6.4 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-ethinyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**52**)

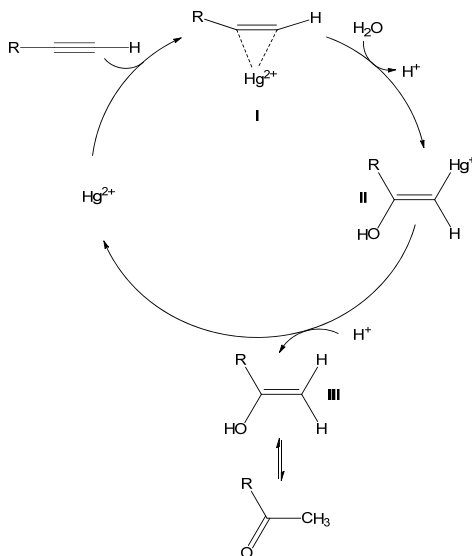
Die Desilylierung des Zwischenproduktes **51** wurde nach der Herstellungsvorschrift von Dunkel¹⁰³ durchgeführt, indem **51** in Tetrahydrofuran mit Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur zum endständigen Alkin **52** mit einer sehr guten Rohausbeute umgesetzt wurde (Schema 3-25).



Schema 3-25: Desilylierung von **51** nach Dunkel¹⁰³; (i) N(C₄H₉)₄F x 3 H₂O, THF, N₂, RT, 20 min, 93% (Rohausbeute).

3.6.5 Synthese von 2-Acetyl-9-*tert*-butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**49**)

Zur Darstellung des 2-Acetylpaullons **49** wurde die von der Arbeitsgruppe Sagitullina et al.¹⁰⁴ beschriebene Methode getestet. Bei dieser Reaktion nach Kucherov wird eine Alkinhydratisierung unter Verwendung eines Hg^{2+} -Salzes als Katalysator durchgeföhrt. Schema 3-26 zeigt einen potentiellen Mechanismus dieser Reaktion.

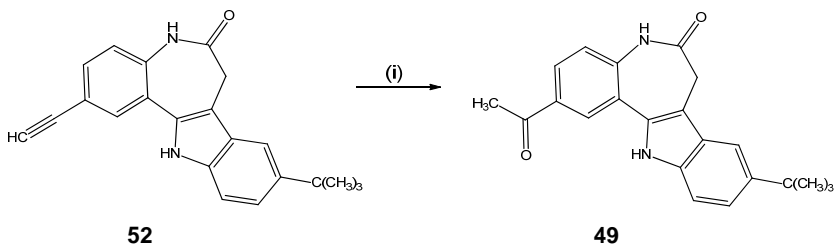


Schema 3-26: Mechanismus der Kucherov-Reaktion (modifiziert nach Hintermann und Labonne¹⁰⁵)

Zuerst koordiniert das Quecksilberkation an das π -System des Alkins (I). Bei dem anschließenden Angriff des Wassers an der Dreifachbindung bildet sich wahrscheinlich das Zwischenprodukt (II). Die säurevermittelte Protodemercurierung liefert das Enol (III), welches durch Tautomerie in das Keton umgewandelt wird.

Nach der Arbeitsvorschrift von Sagitullina et al.¹⁰⁴ wurde das Alkin **52** in wässrigem Aceton unter Zusatz von konz. H_2SO_4 und $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ refluxiert (Schema 3-27). Innerhalb von 30 Minuten wurde das Edukt **52** zum 2-Acetylpaullon **49** umgesetzt. Während der Reaktion wurde auf der DC-Platte ein Startfleck detektiert, der mit einer

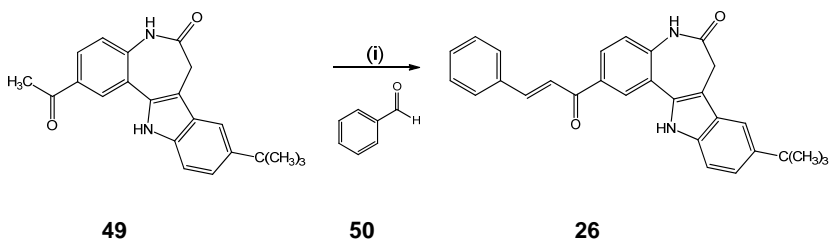
mit Kieselgel gefüllten Fritte abgetrennt wurde. Das Produkt **49** wurde in mittlerer Rohausbeute erhalten und wurde ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Synthese eingesetzt.



Schema 3-27: Hydratisierung des Alkins **52**; (i) $\text{Hg}(\text{OAc})_2$, H_2SO_4 , Aceton, H_2O , Reflux, 40-50 min, 57% (Rohausbeute).

3.6.6 Synthese von 9-*tert*-Butyl-2-[(2*E*)-3-phenylprop-2-enoyl]-7,12-dihydro-indolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**26**)

Für die Darstellung des inversen Chalkons **26** wurden die von Berger¹⁰⁰ beschriebenen Reaktionsbedingungen angewandt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine klassische Claisen-Schmidt-Reaktion, bei der ein aromatischer Aldehyd mit einem Keton gemäß einer Aldolkondensation reagiert. Das Keton **49** wurde mit Benzaldehyd (**50**) in Ethanol unter Zugabe von Kaliumhydroxid bei Raumtemperatur gerührt (Schema 3-28).



Schema 3-28: Umsetzung des Ketons **49** mit Benzaldehyd (**50**) nach einer Claisen-Schmidt-Reaktion¹⁰⁶; (i) KOH , EtOH , $0\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 8 Tage, 2%.

Laut DC-Kontrolle war nach acht Tagen nur noch wenig Edukt **49** im Reaktionsansatz nachweisbar. Da sich aber während der Reaktion mehrere Nebenprodukte bildeten, wurde die Reaktion nach dieser Zeit beendet. Mit Hilfe der Säulenchromatographie erfolgte die Isolierung des gewünschten Produkts **26** mit sehr schlechter Ausbeute.

Die Verbindung **26** besitzt eine Doppelbindung und kann als *cis*- oder *trans*-Isomer vorliegen. Im ^1H -NMR-Spektrum zeigen die Protonen an der Doppelbindung eine Kopplungskonstante von $J = 15.6 \text{ Hz}$, die auf eine (*E*)-Konfiguration von **26** schließen lässt.

4. Biologische Aktivität

4.1 Affinitätschromatographische Untersuchungen zur Identifizierung von biologischen Zielstrukturen der Paullon-Chalkon-Hybride

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Paullon-Chalkon-Hybrid **20** synthetisiert, um dieses für affinitätschromatographische Untersuchungen einzusetzen. Diese wurden von Frau Ma'ayan Papini¹⁰⁷ aus dem Arbeitskreis von Prof. Charles L. Jaffe an der Hebrew University of Jerusalem durchgeführt. Für die Affinitätsuntersuchung wurde die Verbindung **20** zunächst unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC) an Diaminodipropylamin-derivatisierte Agarose **53** angeknüpft (Abb. 4.1).

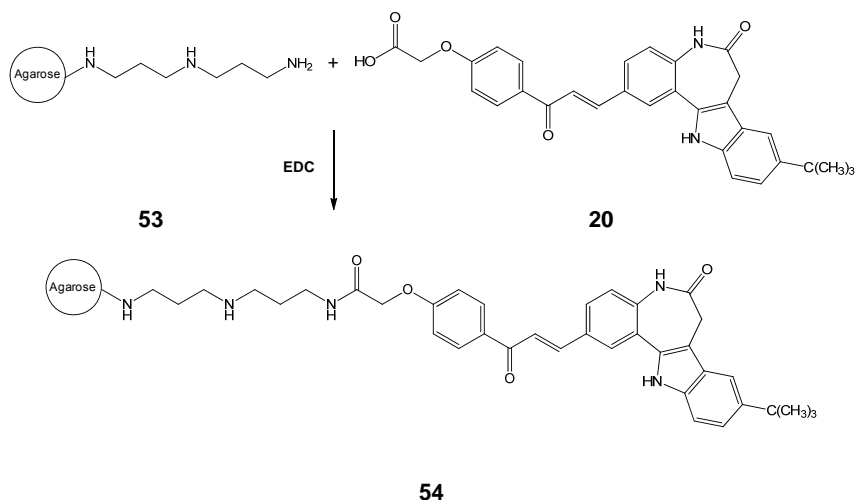


Abb. 4-1: Immobilisierung des Paullon-Chalkon-Hybrids **20** an Diaminodipropylamin-derivatisierte Agarose unter Bildung eines Carbonsäureamids **54**

Anschließend wurde das immobilisierte Paullon-Chalkon-Hybrid **54** mit einem Leishmanien-Homogenat aus *L. donovani*-Promastigoten (Zelllinie *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S-CL2D) inkubiert. Bei diesem Vorgang wurden Proteine, die eine Affinität zu dem immobilisierten Paullon-Chalkon-Hybrid besitzen, an dieses gebunden. Die Matrix wurde mit einer tensidhaltigen TRIS-gepufferten Salzlösung gewaschen um nicht gebundene Proteine abzutrennen. Um die gebundenen

Proteine zu eluieren, wurde die Matrix mit SDS-PAGE Probenpuffer erhitzt. Die eluierten Proteine wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese getrennt und durch Silberfärbung detektiert.

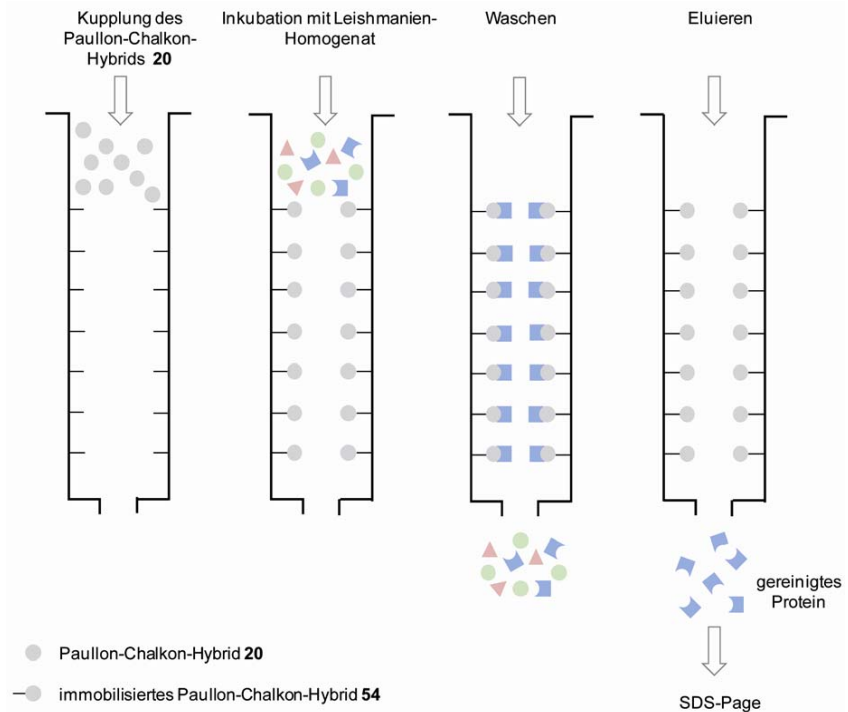


Abb. 4-2: Prinzip der Affinitätschromatographie

Abbildung 4-3 zeigt das Ergebnis der affinitätschromatographischen Untersuchung. In der Fraktion, die nach Elution der Paullon-Chalkon-Matrix **54** gewonnen wurde, konnte nach der elektrophoretischen Trennung mit Hilfe der Silberfärbung eine Hauptproteinbande visualisiert werden. Die Untersuchungen zur Identifizierung dieses Proteins waren bis zum Druck der hier vorgelegten Arbeit noch nicht abgeschlossen.

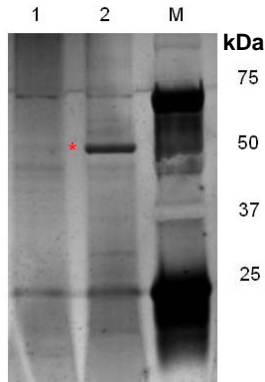


Abb. 4-3: Silberfärbung nach Inkubation mit Leishmanien-Homogenat; Negativkontrolle mit Matrix (1), Paullon-Chalkon-Matrix **54** (2), Molekularmarker (M), Proteinbande (*).

4.2 AlamarBlue®-Assay: Bestimmung der antiprotozoalen Aktivität und der Toxizität

Die zytotoxischen Eigenschaften der getesteten Substanzen wurden in einem Alamar-Blue®-Assay ermittelt. Bei diesem Test kommt der wasserlösliche, nicht toxische Redoxfarbstoff Resazurin (AlamarBlue®) zum Einsatz, der in lebenden Zellen zum fluoreszierenden Resorufin umgewandelt wird (Abb. 4-4). Werden Zellen durch zytotoxisch wirksame Substanzen geschädigt, kommt es zu einer verminderten Reduktion des Resazurins und die Intensität der Fluoreszenz nimmt ab. Demzufolge ist die Fluoreszenz ein Parameter für die Zellviabilität.

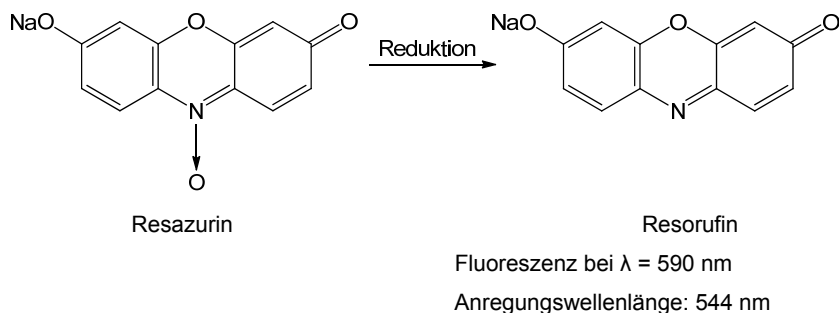


Abb. 4-4: Reduktion des Farbstoffs Resazurin in proliferierenden Zellen.

Für die Bestimmung der antileishmaniellen Aktivität wurden axenische Amastigoten (Zelllinie *L. donovani* MHOM/SD/1962/1S-CL2D) verwendet.¹⁰⁸ Die amastigote Form der Leishmanien, die in den Makrophagen parasitiert, ruft im Wirbeltier verschiedene Krankheitssymptome hervor, während die extrazelluläre, promastigote Form in der Sandmücke existiert. Promastigoten und Amastigoten unterscheiden sich in ihren morphologischen und zellphysiologischen Eigenschaften.¹⁰⁹ Dieses Phänomen zeigt sich auch in der variierende Empfindlichkeit der jeweiligen Form gegenüber Testsubstanzen.¹¹⁰ Daher ist es sinnvoll, die leishmanizide Wirkung von Testsubstanzen an Amastigoten zu untersuchen. Bei axenischen Amastigoten handelt es sich um eine spezielle Form des Erregers, bei der die unbegeißelte Form ohne seinen Wirtsorganismus kultiviert wird.¹¹¹

Trypomastigoten (Blutform) des Trypanosomenstamms *Trypanosoma brucei rhodesiense* (STIB 900 (S704) Tansania) wurden bei der Ermittlung der antitrypanosomalen Aktivität eingesetzt. Dabei handelt es sich um den Klon einer Population, die bei einem Menschen im Jahr 1982 in Tansania isoliert worden ist.

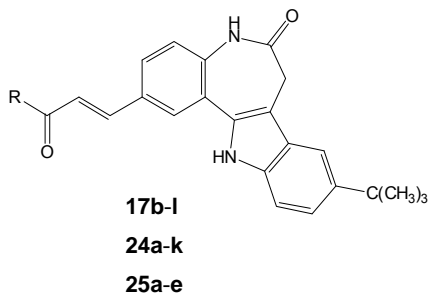
Zur Bestimmung der Toxizität gegenüber menschlichen Zellen wurden THP-1-Makrophagen als Modell verwendet. Diese Zellen wurden aus dem Blut eines einjährigen Jungen isoliert, der unter monozytischer Leukämie litt.¹¹² Unter entsprechenden Bedingungen können THP-1-Zellen zu Makrophagen differenzieren.¹¹³ Da es sich bei Leishmanien um intrazelluläre Erreger handelt, die im Menschen in den Makrophagen parasitieren, sind toxische Eigenschaften der Testsubstanzen gegenüber diesen Zellen von besonderem Interesse.

4.3 Antileishmanielle Aktivität

Um einen Vergleich der im Rahmen der vorgelegten Arbeit neu erschlossenen Substanzen **24a-k** und **25a-e** mit den bereits von Reichwald⁶⁹ synthetisierten Paullon-Chalkon-Hybriden **17b-l** zu ermöglichen, sind die biologischen Testergebnisse dieser Verbindungsklasse in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Die Zimtsäureamide **24** und Zimtsäureanilide **25** wurden mit dem Ziel synthetisiert, Verbindungen zu erhalten, die keine Chalkon-Teilstruktur mehr besitzen und in die löslichkeitserhöhende Strukturelemente eingebunden sind.

Tabelle 4-1: Antileishmanielle Aktivität der Paullon-Chalkon-Hybride **17b-l** und der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e**



	R	Inhibition [%] AxA bei 15 µM	Letalität [%] für Makrophagen bei 5 µM
17b	Pyridin-3-yl	98.1 ± 0.4 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
17c	2,4-di-H ₃ CO-Ph	93.6 ± 2.2 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
17d	2,5-di-H ₃ CO-Ph	96.8 ± 0.2 ^a	95.7 ± 1.3 ^a
17e	Ph	99.0 ± 0.4 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
17f	4-OH-Ph	97.2 ± 0.7 ^a	80.3 ± 16.7 ^a
17g	4-H ₃ CO-Ph	97.5 ± 1.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
17h	4-Cl-Ph	98.3 ± 0.4 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
17i	3,4-di-H ₃ CO-Ph	95.5 ± 0.2 ^a	49.7 ± 6.3 ^a
17j	3,4,5-tri-H ₃ CO-Ph	96.8 ± 0.1 ^a	92.7 ± 3.8 ^a
17k	Furan-2-yl	97.6 ± 0.2 ^a	3.3 ± 3.3 ^a
17l	Thiophen-2-yl	98.8 ± 0.3 ^a	60.5 ± 6.5 ^a
24a	Morpholin-4-yl	9.0 ^c	NT ^c
24b	Piperidin-1-yl	70.7 ^c	70 ^c

	R	Inhibition [%] AxA bei 15 µM	Letalität [%] für Makrophagen bei 5 µM
24c	(C ₂ H ₅) ₂ N-	72.3 ^c	66 ^c
24d	Benzyl-NH-	95.1 ^c	34 ^c
24e	4-Methylpiperazin-1-yl	67.4 ^c	59 ^c
24f	4-H ₃ C-Benzyl-NH-	52.5 ± 0.9 ^b	82.1 ± 0.4 ^b
24g	4-H ₃ CO-Benzyl-NH-	42.7 ± 3.7 ^b	88.2 ± 0.7 ^b
24h	4-Cl-Benzyl-NH-	77.3 ± 2.2 ^b / 53.5 ± 1.5 ^b	92.2 ± 0.7 ^b
24i	2-F-Benzyl-NH-	79.3 ± 3.6 ^b / 61.1 ± 0.9 ^b	84.4 ± 0.8 ^b
24j	Pyridin-3-ylmethyl-NH-	18.6 ± 5.0 ^b	76.2 ± 4.9 ^b
24k	Pyridin-2-ylmethyl-NH-	63.6 ± 2.6 ^b	73.4 ± 5.9 ^b
25a	Ph-NH-	94.4 ^c	73 ^c
25b	3-Cl-Ph-NH-	81.4 ^c	77 ^c
25c	4-Cl-Ph-NH-	88.0 ^c	59 ^c
25d	4-H ₃ C-Ph-NH-	82.2 ^c	70 ^c
25e	4-H ₃ CO-Ph-NH-	81.8 ^c	55 ^c

Erläuterung: ^aMittelwerte ± SEM durch Doppel- oder Dreifachbestimmung⁷¹;

^bMittelwerte ± SEM; SEM = Standardabweichung der Mittelwerte; ^cAngaben gemäß M. Papini¹⁰⁷; AxA = axenische Amastigoten; NT = nicht getestet.

Die Hemmkonzentrationen der Zimtsäureanilide **25a-e** an axenischen Amastigoten liegen im mikromolaren Bereich. Allerdings sind die Verbindungen **25a-e** toxisch für die Wirtszellen. Im Vergleich mit den Zimtsäureamiden **24d** und **f-i**, charakterisiert durch eine Benzylamidstruktur, zeigen die Zimtsäureanilide **25a-e** eine stärkere antileishmanielle Aktivität an axenischen Amastigoten bei 15 μM .

Die biologischen Ergebnisse der Zimtsäureanilide **25a**, **c** und **e** und der analogen Paullon-Chalkon-Hybride **17e**, **h** und **g** zeigen, dass die Substitution der α,β -ungesättigten Carbonylstruktur gegen eine Propenamidstruktur zu einem starken Anstieg der Toxizität führt bei gleichzeitiger Abschwächung der Hemmaktivität an axenischen Amastigoten.

Vergleicht man die Ergebnisse der Verbindungen **24a**, **b** und **e**, bei denen der Stickstoff der Zimtsäureamidstruktur in einem Ringsystem eingebunden ist, besitzt die Substanz **24a** mit einem Morpholinrest die geringste Hemmwirkung auf axenische Amastigoten. Im Test mit den THP-1-Makrophagen zeigen die Zimtsäureamide **24b** und **e** toxische Eigenschaften.

Das Zimtsäureamid **24d**, welches über eine unsubstituierte Benzylamidstruktur verfügt, hemmt in einer Konzentration von 15 μM das Amastigotenwachstum zu 95%. Gleichzeitig ist **24d** weniger toxisch als die Verbindungen **24b**, **c** und **e**. Mit dem Ziel, Zimtsäureamide mit guter antileishmanieller Aktivität und gleichzeitig geringer Toxizität zu erhalten, wurden die Substanzen **24f-k** synthetisiert. Im axenischen Amastigoten-Assay zeigen die Derivate **24f-k** eine schwächere Hemmung des Amastigotenwachstums als die Grundstruktur **24d**. Desweiteren führen die Zimtsäureamide **24f-k** im Toxizitätsassay auch zu einer Schädigung der Wirtszellen. Somit konnte mit diesen Modifikationen weder die antileishmanielle Aktivität noch das Toxizitätsprofil der *N*-Benzyl-Zimtsäureamide optimiert werden.

Interessant sind die Ergebnisse der beiden Strukturisomere **24j** und **k**, die sich nur in der Anknüpfungsstelle des Pyridinrestes unterscheiden. **24j** hemmt das Amastigotenwachstum mit nur 18.6% bei 15 μM und führt zu einer 76%igen Abtötung der THP-1-Makrophagen bei einer Konzentration von 5 μM . Das Isomer **24k** hingegen zeigt eine stärkere Inhibition im Amastigoten-Assay bei annähernd gleicher Toxizität.

Im Vergleich mit den Paullon-Chalkon-Hybriden **17b-l** zeigen die Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** im Amastigoten-Assay geringere antileishmanielle Aktivität. Da zudem alle neuen Zimtsäureamide eine deutliche Toxizität gegen

Makrophagen zeigten, ist festzuhalten, dass der Austausch der reaktiven α,β -ungesättigten Carbonylstruktur der Chalkon-Untereinheit gegen eine Propenamidstruktur weder einen Vorteil bezüglich der antileishmaniellen Aktivität noch bezüglich des Toxizitätsprofils erbrachte.

Die Verbindungen **24a** und **e** wurden synthetisiert, um löslichkeitserhöhende Strukturen einzufügen. **24a** enthält einen Morpholinsauerstoff, der als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren kann, während **24e** über einen basischen 4-Methylpiperazinrest verfügt. Beide Verbindungen lieferten enttäuschende Ergebnisse bei der biologischen Testung gegen Leishmanien. **24a** zeigte nur eine schwache antileishmanielle Aktivität. Im Gegensatz dazu hemmte **24e** zwar das Amastigotenwachstum, erwies sich aber als ebenso toxisch für Makrophagen wie andere Analoga dieser Reihe.

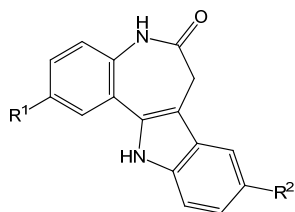
Für das Dihydrochalkon **21** und das inverse Chalkon **26** lagen die Ergebnisse der biologischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit noch nicht vor.

4.4 Antitrypanosomale Aktivität

Bei einem im Arbeitskreis von Prof. Charles L. Jaffe durchgeführten Screening wurde für eine Reihe von bereits bekannten Paullonen (**16a**, **c-e**, **17a-l**, **19a**, **b** und **55**) antitrypanosomale Aktivität festgestellt. Aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit wurden auch die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Verbindungen **24** und **25** an Trypomastigoten getestet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 zusammengestellt.

Für die Zimtsäureamide **24f-k**, das Dihydrochalkon **21** und das inverse Chalkon **26** lagen die biologischen Daten zur antitrypanosomalen Aktivität zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit noch nicht vor.

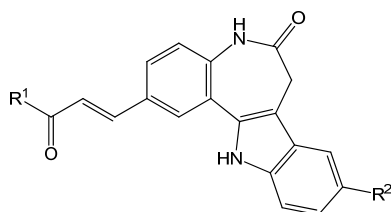
Tabelle 4-2: Antitrypanosomale Aktivität^a der Paullon-Chalkon-Hybride **17a-l**, der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-e** und **25a-e** und der Paullon-derivate **16a**, **c-e**, **19a**, **b** und **55**



16a, c-e

19a, b

55



17a-l

24a-e

25a-e

	R¹	R²	Wachstumsinhib. [%] für Trypomastigoten bei		GI₅₀ Tryp.	Letalität [%] für Makrophagen bei
			5 µM	15 µM		5 µM
16a		CF ₃	72.0	NT	NT	57.2 ± 2.5 ^b
16c		CH ₃	84.2	NT	NT	0 ^b

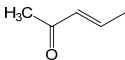
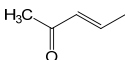
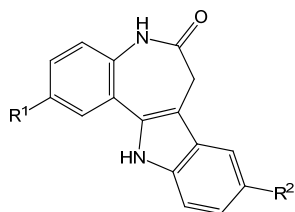
	R ¹	R ²	Wachstumsinhib. [%] für Trypomastigoten bei		GI ₅₀ Tryp.	Letalität [%] für Makrophagen bei 5 µM
			5 µM	15 µM		
16d		H	90.1	NT	4.2	0 ^b
16e		OCH ₃	99.2	NT	1.8	0
17a	Ph	H	97.3	NT	1.4	0.0 ± 0.0 ^b
17b	Pyridin-3-yl	C(CH ₃) ₃	100.2	99.0	5.5	0.0 ± 0.0 ^b
17c	2,4-di-H ₃ CO-Ph	C(CH ₃) ₃	35.4	73.5	NT	0.0 ± 0.0 ^b
17d	2,5-di-H ₃ CO-Ph	C(CH ₃) ₃	96.9	98.1	1.2	95.7 ± 1.3 ^b
17e	Ph	C(CH ₃) ₃	66.3	98.8	3.8	0.0 ± 0.0 ^b
17f	4-OH-Ph	C(CH ₃) ₃	95.1	98.7	NT	80.3 ± 16.7 ^b
17g	4-H ₃ CO-Ph	C(CH ₃) ₃	35.7	81.5	NT	0.0 ± 0.0 ^b
17h	4-Cl-Ph	C(CH ₃) ₃	55.7	98.8	NT	0.0 ± 0.0 ^b
17i	3,4-di-H ₃ CO-Ph	C(CH ₃) ₃	82.7	99.1	NT	49.7 ± 6.3 ^b
17j	3,4,5-tri-H ₃ CO-Ph	C(CH ₃) ₃	83.5	97.2	NT	92.7 ± 3.8 ^b
17k	Furan-2-yl	C(CH ₃) ₃	98.6	97.8	0.6	3.3 ± 3.3 ^b
17l	Thiophen-2-yl	C(CH ₃) ₃	96.3	98.3	0.9	60.5 ± 6.5 ^b

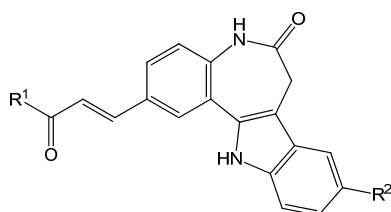
Tabelle 4-2 (Fortsetzung): Antitrypanosomale Aktivität^a der Paullon-Chalkon-Hybride **17a-l**, der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-e** und **25a-e** und der Paullonderivate **16a, c-e, 19a, b** und **55**



16a, c-e

19a, b

55

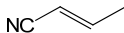


17a-l

24a-e

25a-e

	R ¹	R ²	Wachstumsinhib. [%] für Trypomastigoten bei		GI ₅₀ Tryp.	Letalität [%] für Makrophagen bei
			5 µM	15 µM		5 µM
19a		C(CH ₃) ₃	81.3	NT	NT	9.0 ^b
19b		OCH ₃	33.7	NT	NT	3
24a	Morpholin-4-yl	C(CH ₃) ₃	32.2	86.5	3.9	NT
24b	Piperidin-1-yl	C(CH ₃) ₃	41.6	80.4	4.7	70
24c	(C ₂ H ₅) ₂ N-	C(CH ₃) ₃	35.0	97.8	1.1	66
24d	Benzyl-NH-	C(CH ₃) ₃	43.6	97.6	3.5	34
24e	4-Methyl- piperazin-1-yl	C(CH ₃) ₃	88.7	98.7	24.5	59

	R ¹	R ²	Wachstumsinhib. [%] für Trypomastigoten bei		GI ₅₀ Tryp.	Letalität [%] für Makrophagen bei
			5 µM	15 µM		5 µM
25a	Ph-NH-	C(CH ₃) ₃	98.2	99.1	1.5	73
25b	3-Cl-Ph-NH-	C(CH ₃) ₃	95.5	97.3	1.6	77
25c	4-Cl-Ph-NH-	C(CH ₃) ₃	95.9	98.7	2.3	59
25d	4-H ₃ C-Ph-NH-	C(CH ₃) ₃	55.9	98.2	1.7	70
25e	4-H ₃ CO-Ph-NH-	C(CH ₃) ₃	96.1	99.7	2.9	55
55		C(CH ₃) ₃	24.8	31.6	NT	0 ^b

Erläuterung: ^aWerte zitiert gemäß M. Papini¹⁰⁷ bzw. Reichwald et al.⁷¹; ^bMittelwerte ± SEM durch Doppel- oder Dreifachbestimmung⁷¹; Werte ohne Standardabweichungen stammen aus Einzelbestimmungen⁷¹; SEM = Standardabweichung der Mittelwerte; NT = nicht getestet.

Die Untersuchung der Zimtsäureamide **24a-e** und der Zimtsäureanilide **25a-e** zeigte eine gute Hemmung des Trypomastigotenwachstums mit GI_{50} -Werten im Bereich von 1 bis 5 μ M. Eine Ausnahme stellte die Verbindung **24e** dar, die einen GI_{50} -Wert von 24.5 μ M aufwies. Wie bereits unter 4.3 beschrieben, wirken sich alle im Toxizitätsassay getesteten Zimtsäureamide bzw. -anilide schädlich auf die THP-1-Makrophagen aus.

Die antileishmaniellen und die antitrypanosomalen Aktivitäten der einzelnen in dieser Arbeit vorgestellten Verbindungen sind jeweils sehr ähnlich. Beispielsweise gehörten die Paullon-Chalkon-Hybride **17k** und **17l**, die die niedrigsten GI_{50} -Werte im Assay an Trypomastigoten zeigten, auch zu den potentesten antileishmaniellen Wirkstoffen (vgl. mit Tabelle 4-1). Diese Parallelität könnte auf einen ähnlichen Wirkmechanismus in Leishmanien und Trypanosomen hinweisen. Das Zimtsäureamid **24a** zeigt ein abweichendes Profil, da es das Wachstum der Trypomastigoten bei 15 μ M zu 87% hemmte, während es an den axenischen Amastigoten der Leishmanien nur zu einer Wachstumshemmung von 9% führte.

Die Paullon-Chalkon-Hybride **17b**, **d-f** und **h-l** zeigten bei einer Konzentration von 15 μ M (Verbindung **17a** bei 5 μ M) eine Wachstumshemmung der Trypomastigoten von über 95%. Von den Substanzen **17a**, **b**, **d**, **e**, **k** und **l** wurden zusätzlich die GI_{50} -Werte ermittelt, die im niedrigmikromolaren Bereich bzw. bei **17k** und **l** sogar knapp unter 1 μ M lagen. Die Paullon-Chalkon-Hybride **17** weisen demzufolge eine ähnliche antitrypanosomale Aktivität auf wie die Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24** und **25**. Letztere haben jedoch den generellen Nachteil einer stärkeren toxischen Wirkung.

4.5 Physikochemische Eigenschaften

Bei der Wirkstoffentwicklung muss neben der Erhöhung der Wirkstärke und Selektivität einer Substanz auch deren Pharmakokinetik betrachtet werden. Unter Umständen kann nämlich eine Strukturmodifikation, die zu einer Verbesserung der Wirkstärke führt, gleichzeitig das pharmakokinetische Profil verschlechtern. Insofern ist es wichtig, die Pharmakodynamik und -kinetik bei der Wirkstoff-Optimierung zu berücksichtigen.

Ob eine Substanz als orales Arzneimittel appliziert werden kann, hängt u.a. von seinen physikochemischen Eigenschaften ab. Die Regeln nach Lipinski¹¹⁴ („Rule of Five“) lassen eine grobe Einschätzung der oralen Bioverfügbarkeit einer Substanz zu. Demzufolge können ein Molekulargewicht von mehr als 500 g/mol, mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren oder mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren in einem Molekül sowie ein LogP-Wert größer als fünf zu einer schlechteren Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes führen. Der LogP-Wert ist der dekadische Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und gibt an, in welchem Maß eine Substanz hydrophile bzw. lipophile Eigenschaften besitzt. Verstößt eine Substanz gegen zwei oder mehr dieser „Lipinski-Kriterien“, können bei der oralen Bioverfügbarkeit Probleme erwartet werden. Es gibt jedoch auch Wirkstoffe wie Antibiotika oder herzwirksame Glykoside, die trotz einer Verletzung der Lipinski-Regeln oral bioverfügbar sind. Ursache dieser Abweichung von den Lipinski-Regeln kann eine Absorption über Transport-Mechanismen im Darm sein. Andererseits muss es sich bei Substanzen, die die „Rule of Five“ erfüllen, nicht zwangsläufig um „Pharmakon-ähnliche“ („drug-like“) Moleküle handeln.¹¹⁵ Somit müssen diese Kriterien mit gewissen Einschränkungen bzw. als „grobmaschiger Filter“ betrachtet werden. Infolgedessen ist es sinnvoll, noch andere Pharmakokinetik beeinflussende Kenngrößen in die Bewertung einer Substanz einfließen zu lassen.

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist die polare Oberfläche (PSA, polar surface area) eines Moleküls, die sich auf dessen Absorption auswirkt. Dabei handelt es sich um die Summe der Van-der-Waals-Oberflächen polarer Atome in einem Molekül. Für die Berechnung der PSA wurde in dieser Arbeit die Methode von Ertl et al.¹¹⁶ angewandt, bei der die tabellarisch vorhandenen PSA-Werte einzelner Molekülfragmente summiert werden und den TPSA-Wert (topological polar surface area) liefern. Generell sollte der PSA-Wert nicht über 140 Å² liegen.

Des Weiteren kann auch die Flexibilität eines Moleküls, beschrieben durch die Anzahl der rotierbaren Bindungen, einen Effekt auf die Bioverfügbarkeit haben. Dabei handelt es sich um Einfachbindungen zwischen zwei Atomen. Terminale Atome, H-Atome, Bindungen in Ringen und Amidbindungen werden nicht gezählt. Tierversuche von Veber et al.¹¹⁷ zeigten, dass 10 oder weniger rotierbare Bindungen und PSA-Werte unter 140 \AA^2 sich positiv auf die Bioverfügbarkeit bei Ratten auswirkten. Demzufolge ist es sinnvoll, neben den Regeln nach Lipinski auch die polare Oberfläche sowie die Anzahl der rotierbaren Bindungen eines Moleküls bei dem Entwurf neuer Wirkstoffe zu berücksichtigen. Dabei sollte bedacht werden, dass die eben genannten Parameter sich gegenseitig beeinflussen. Wird z. B. die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bzw -Donoren verändert, ändern sich auch die anderen Eigenschaften wie z. B. die Lipophilie oder der PSA-Wert.

Da die Zielverbindungen **21**, **24a-k**, **25a-e** und **26** eventuell als Leitstrukturen für eine Arzneistoffentwicklung in Frage kommen könnten, sind die physikochemischen Eigenschaften dieser Substanzen von Bedeutung. Deshalb wurden für **21**, **24a-k**, **25a-e** und **26** der miLogP, der TPSA-Wert und die Anzahl der rotierbaren Bindungen mit der Software von Molinspiration¹¹⁸ kalkuliert (Tabelle 4-3), um eine Abschätzung der oralen Bioverfügbarkeit zu ermöglichen. Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte für die Paullon-Chalkon-Hybride **17a-l** in der Tabelle 4-3 aufgeführt.

Tabelle 4-3: Physikochemische Eigenschaften der Verbindungen **17a-l**, **21**, **24a-k**, **25a-e** und **26** berechnet mit Molinspiration¹¹⁸

	Anzahl der Regel- brüche	miLogP [*]	M _r	TPSA	Anzahl der O- und N- Atome	Anzahl der OH- und NH- Gruppen	Anzahl der rotierbaren Bindungen
17a	0	4.782	378.4	62.0	4	2	3
17b	1	5.227	435.5	74.9	5	2	4
17c	1	6.505	494.6	80.4	6	2	6
17d	1	6.505	494.6	80.4	6	2	6
17e	1	6.464	434.5	62.0	4	2	4
17f	1	5.985	450.5	82.2	5	3	4
17g	1	6.521	464.6	71.2	5	2	5
17h	1	7.142	469.0	62.0	4	2	4
17i	1	6.11	494.6	80.4	6	2	6
17j	2	6.095	524.6	89.7	7	2	7
17k	1	5.721	424.5	75.1	5	2	4
17l	1	6.363	440.6	62.0	4	2	4
21	1	6.435	436.6	62.0	4	2	5
24a	0	4.513	443.5	74.4	6	2	3
24b	1	5.575	441.6	65.2	5	2	3
24c	1	5.419	429.6	65.2	5	2	5
24d	1	5.821	463.6	74.0	5	3	5
24e	0	4.559	456.6	68.4	6	2	3
24f	1	6.27	477.6	74.0	5	3	5

Tabelle 4-3 (Fortsetzung): Physikochemische Eigenschaften der Verbindungen **17a-l**, **21**, **24a-k**, **25a-e** und **26** berechnet mit Molinspiration¹¹⁸

	Anzahl der Regel- brüche	miLogP*	M _r	TPSA	Anzahl der O- und N- Atome	Anzahl der OH- und NH- Gruppen	Anzahl der rotierbaren Bindungen
24g	1	5.878	493.6	83.2	6	3	6
24h	1	6.499	498.0	74.0	5	3	5
24i	1	5.937	481.6	74.0	5	3	5
24j	0	4.585	464.6	86.9	6	3	5
24k	0	4.651	464.6	86.9	6	3	5
25a	1	6.12	449.6	74.0	5	3	4
25b	1	6.774	484.0	74.0	5	3	4
25c	1	6.798	484.0	74.0	5	3	4
25d	1	6.568	463.6	74.0	5	3	4
25e	1	6.176	479.6	83.2	6	3	5
26	1	6.464	434.5	62.0	4	2	4

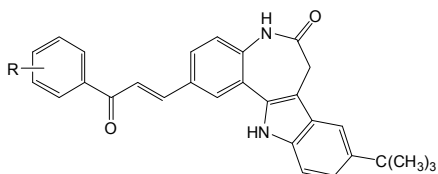
* miLogP = mit Molinspiration¹¹⁸ kalkulierter LogP-Wert

Gemäß Lipinski erfüllen die Paullon-Chalkon-Hybride **17b-i** und **k, l** drei der vier Kriterien. Die berechneten miLogP -Werte dieser Substanzen liegen oberhalb von 5 und sind somit außerhalb des geforderten Bereichs. Verbindung **17a** verstößt gegen keinen Lipinski-Parameter. **17j** verletzt zwei Regeln, da der berechnete miLogP -Wert größer 5 ist sowie ein Molekulargewicht von über 500 g/mol vorliegt. Sowohl die kalkulierten TPSA-Werte zwischen 60 und 90 Å² als auch die Anzahl der rotierbaren Bindungen der Paullon-Chalkon-Hybride **17a-l** liegen in den empfohlenen Bereichen.

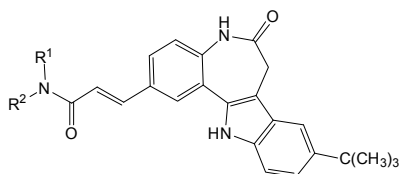
Die in Tabelle 4-3 aufgeführten Ergebnisse der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24a-k** und **25a-e** und der Verbindungen **26** und **21** und zeigen, dass die Lipinski-Regeln maximal einmal gebrochen werden. Vier der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride (**24a, e, j** und **k**) halten sogar alle geforderten Eigenschaften nach Lipinski ein. Die Anwesenheit von 2 bis 6 rotierbaren Bindungen in den Substanzen **24a-k, 25a-e, 21** und **26** und die TPSA-Werte im Bereich von 40 bis 90 Å² befinden sich in einem akzeptablen Rahmen. Unter Berücksichtigung dieser Werte sind **21, 24a-k, 25a-e** und **26** als "Arzneistoff-ähnliche" Strukturen anzusehen, von denen eine hinreichende Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation erwartet werden kann.

5. Zusammenfassung

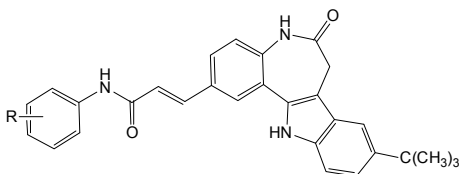
Bei einer Untersuchung verschiedener Paullonderivate an *Leishmania donovani* wurden die Paullon-Chalkon-Hybride **17** als neue antileishmanielle Leitstruktur entdeckt. Mit dem Ziel, die antiprotozoale Aktivität, das Toxizitätsprofil und die physikochemischen Eigenschaften zu verbessern, wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit die Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24** und **25** als Abwandlung der Struktur **17** dargestellt.



17



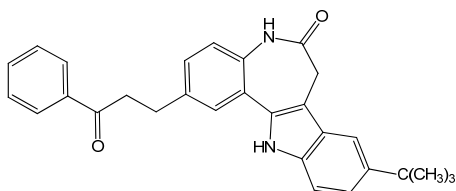
24



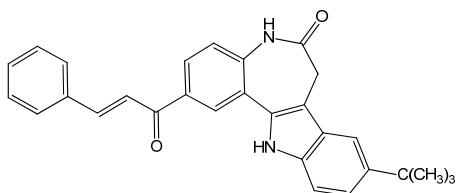
25

24 und **25** zeigen bei *in vitro*-Untersuchungen an isolierten Erregern (*Trypanosoma brucei rhodesiense* Trypomastigoten und axenische Amastigoten von *Leishmania donovani*) antiparasitäre Aktivität mit Hemmkonzentrationen im mikromolaren Bereich. Allerdings erwiesen sich die Verbindungen bei Tests an THP-1-Zellen in ähnlichen Konzentrationen als toxisch für humane Zellen.

Des Weiteren wurden ein Dihydrochalkon-Paullon-Hybrid **21** und ein Paullon-Chalkon-Hybrid **26** mit einer invertierten α,β -ungesättigten Carbonylstruktur synthetisiert, um den Einfluss der Chalkonstruktur auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu untersuchen.

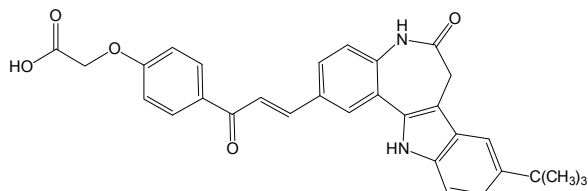


21



26

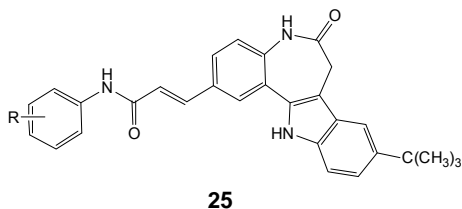
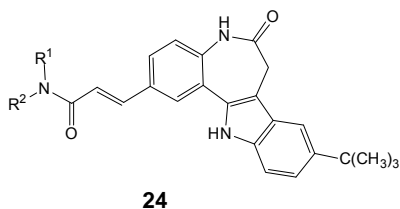
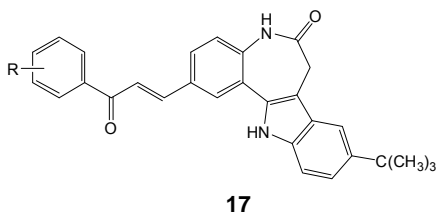
Zur Identifizierung des leishmaniellen Targets der Paullon-Chalkon-Hybride **17** wurde die Verbindung **20** synthetisiert. Kooperationspartner konnten **20** über die freie Carboxylgruppe an einem festen Trägermaterial (Diaminodipropylaminderivatisierte Agarose) immobilisieren. Eine anschließende affinitätschromatographische Trennung von Proteinen eines Leishmanien-Homogenats führte zur Isolierung eines bisher nicht identifizierten Proteins, das als Zielstruktur der hier bearbeiteten Wirkstoffklasse in Frage kommt.



20

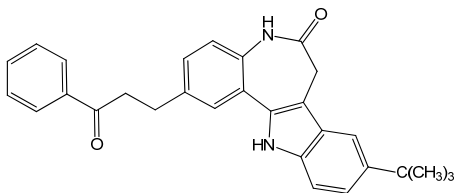
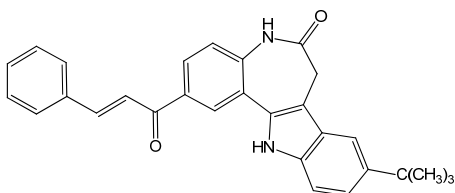
6. Summary

A study of several paullone derivatives on *Leishmania donovani* revealed chalcone paullone hybrid molecules **17** as new antileishmanial lead structures. In the course of this thesis the cinnamamide paullone hybrids **24** and **25** were synthesized as a modification of **17** with the aim to improve antiprotozoal activity, toxicity profile and drug-like and physicochemical properties.

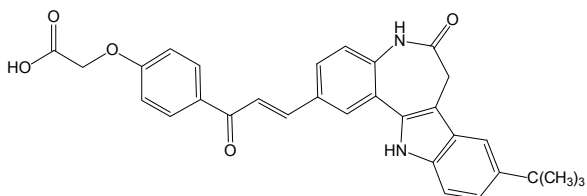


In *in vitro* assays with isolated pathogens (*Trypanosoma brucei rhodesiense* trypomastigotes and *Leishmania donovani* axenic amastigotes) **24** and **25** show an antiparasitic activity with inhibitory concentrations in the micromolar range. However, testing with THP-1 cells demonstrated that the compounds are toxic to human cells in similar concentrations.

Additionally, a dihydrochalcone paullone hybrid **21** and a chalcone paullone hybrid **26** with an inverted α,β -unsaturated carbonyl structure were synthesized in order to examine the influence of the chalcone scaffold regarding the structure-activity relationships.

**21****26**

With the intention to identify the leishmanial target of the chalcone paullone hybrids **17**, compound **20** was prepared. Scientists of a collaborating research group immobilized **20** through its free carboxyl group on a resin (diaminodipropylamine derivatized cross-linked agarose). A subsequent protein separation of a *Leishmania* homogenate using affinity chromatography led to the isolation of a yet unidentified protein which can be considered as a target of the compound class presented here.

**20**

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Geräte und Methoden

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigfolien Polygram® Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, 0.2 mm Kieselgelschicht mit Fluoreszenzindikator, Fa. Macherey-Nagel, Düren. Detektion bei 254 nm und 366 nm. Häufig verwendete Fließmittel: reines Ethylacetat, Ethylacetat/Toluol-Gemische oder Ethylacetat/Cyclohexan-Gemische.

Reagenzien für den Nachweis spezieller funktioneller Gruppen bei der Dünnschichtchromatographie

Ehrlichs Reagenz

Nachweis von primären aromatischen Aminen unter Bildung eines gelb gefärbten Azomethins.

Lösung: *N,N*-Dimethylaminobenzaldehyd (1.0 g) in Methanol (70 mL) und 37%ige Salzsäure (30 mL).

Kaliumpermanganat-Lösung (Bayersche Probe)

Nachweis von aliphatischen Doppelbindungen durch einen sehr schnellen Farbumschlag von Violett nach Gelb (Reduktion des enthaltenen Mangans (VII)).

Lösung: Kaliumpermanganat (79 mg) in Wasser (100 mL).

Elementaranalytik

CE Instruments Flash EA® 1112 Elemental Analyzer, Fa. Thermo Quest, San Jose, CA, USA; Angabe der berechneten (ber.) und gefundenen (gef.) Werte in Prozent.

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), analytisch

LaChrom Elite®: Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300, Diode Array Detector L-2450, OrganizerBox L-2000, Trennsäule Merck LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Probenvorbereitung: 1 mg Probe wird in 1000 µL DMSO gelöst. 400 µL dieser Lösung werden mit DMSO zu 1000 µL verdünnt und anschließend durch einen Acrodisc® MHP 13 µm Filter filtriert. Die gemessene Absorption des Hauptpeaks im Peakmaximum sollte im Bereich von 300-1000 mAU liegen. Gegebenenfalls wird eine Anpassung der Probenkonzentration vorgenommen.

Elution: Injektionsvolumen: 10 µL; Flussrate: 1.000 mL/min; Gesamtlaufzeit: 15 min (Verbindung **24f-i**: 20 min, Verbindung **47**: 25 min); angestrebte Gesamtretentionszeit (t_{M+N}) 5-8 min.

Elutionsmittel: Gemische aus Acetonitril und Wasser (bidest.), Acetonitril und $(Et_3NH)_2SO_4$ -Puffer (pH 2.7) im angegebenen Verhältnis oder Acetonitril/Ameisensäure 0.05% (pH 2.5-2.7). Pufferherstellung: Triethylamin (20 mL) und Natriumhydroxid (242 mg) werden in bidestillierten Wasser zu 1000 mL gelöst und mit konz. Schwefelsäure auf pH 2.7 eingestellt. Herstellung Ameisensäure 0.05%: Ameisensäure (0.5 g) wird in bidestilliertem Wasser (999.5 g) gelöst.

Detektion: Dioden-Array-Detektor bei 254 nm und 280 nm.

Auswertung: Integration der Peakflächen und Auswertung mittels 100%-Methode, Integrationsausschluss 1.55 min, Threshold 500, Bestimmung der Nettoretentionszeit (t_N) und der Totzeit (t_M) bezogen auf DMSO, Absorptionsmaxima (λ_{max}) entnommen aus den UV-Spektren des DAD, verwendete Software: EZ Chrom Elite Client/Server Version 3.1.3.

Infrarotspektroskopie

Thermo Nicolet FT-IR 200, Fa. Thermo Nicolet, Madison, WI, USA; Vermessung der Substanzen als KBr-Presslinge.

Kernresonanzspektroskopie

Bruker Avance DRX-400 (^1H -NMR-Messung: 400.1 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 100.6 MHz), Bruker Avance II-600 (^1H -NMR-Messung: 600.1 MHz; ^{13}C -NMR-Messung: 150.9 MHz), Fa. Bruker, Billerica, MA, USA; NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig; Lösungsmittel: DMSO- d_6 , D_2O .

^1H -NMR: Interner Standard Tetramethylsilan, Angabe der chemischen Verschiebung in ppm nach der δ_{TMS} -Skala; Ermittlung der Protonenverhältnisse nach Integration.

^{13}C -NMR: Interner Standard Tetramethylsilan; Aufnahme der Spektren mit ^1H -Breitbandentkopplung; der Zusatz (2C) verweist auf ein überlagertes Signal zweier isochroner Kohlenstoffatome hin; zusätzliche Durchführung einer ^{13}C -DEPT135-Messung.

Abkürzung der Signalmultiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

Lösungsmittel

Falls nicht anders angegeben, wurden ungetrocknete Lösungsmittel verwendet. Die Trocknung der Lösungsmittel erfolgte in Anlehnung an publizierte Methoden.

Aceton: Aceton (1 L) und Molekularsieb (3 Å) (100 g) werden unter gelegentlichem Umschwenken mehrere Tage stehen gelassen (Statische Trocknung).¹¹⁹

Toluol: In einem Rundkolben mit Wasserabscheider, Kühler und Trockenrohr wird Toluol zum Rückfluss erhitzt. Das Kondensat im Wasserabscheider wird solange abgelassen bis es nicht mehr getrübt ist. Nach dem Abkühlen wird Calciumchlorid (15 g/L) hinzugefügt und ein Tropftrichter mit Druckausgleich zwischen Kolben und Kühler installiert. Bei geöffnetem Hahn wird weitere 2-3 h refluxiert. Anschließend wird bei geschlossenem Hahn das getrocknete Toluol aufgefangen. Das getrocknete Toluol wird über Molekularsieb (4 Å) gelagert.¹²⁰

Massenspektroskopie

Finnigan-MAT 95, Fa. Thermo Finnigan MAT, Bremen; Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig; Elektronenstoß-Ionisation (EI)-MS: Ionisationsenergie 70 eV; Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS): Interner Massenstandard

Perfluorkerosin, Hochauflösung des Signals des Molekülradikalkations $[M]^+$, Angabe der exakten Masse des ungeladenen Moleküls als theoretischer Wert des $[M]^+$.

Parallelsynthese

Carousel 12 Place Reaction Station™, Fa. Radley Discovery Technologies, Shire Hill, Saffron Walden, Essex, Großbritannien.

Säulenchromatographie

Kieselgel 60 (unter 0.063 mm), Fa. Merck, Darmstadt.

Schmelzpunkte

Electrothermal IA 9100, Fa. Barnstedt International, Southend-on-Sea, Essex, Großbritannien.

7.1.2 Ausgangsmaterialien

Die Acrylamide **40a-f** wurden nach der Herstellungsvorschrift von Eriksson et al.⁸⁶ synthetisiert und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

1-Acryloyl-4-methylpiperazin (**40k**) wurde nach der Synthesevorschrift von Le Sann et al.⁸⁷ hergestellt und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Benzylacrylamid (**40l**) und Diethylacrylamid (**40m**) wurden nach der Vorschrift von Kuhnert et al.⁸⁸ hergestellt und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden überwiegend über Acros Organics (Geel, Belgien), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

7.2 Synthesen und analytische Daten

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV 1): Synthese der 2-[(1*E*)-3-Aryl-3-oxoprop-1-en-1-yl]paullone **17e** und **f**

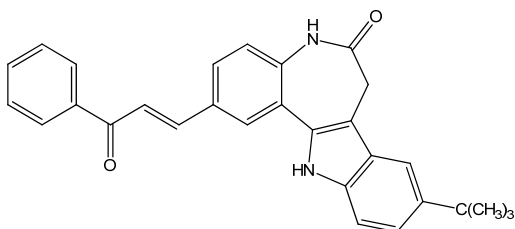
9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 430 mg, 1.00 mmol) wird mit *N,N*-Dimethyl-3-oxo-3-phenyl-1-propanaminiumchlorid (**36a**, 234 mg, 1.10 mmol) bzw. mit 3-(4-Hydroxyphenyl)-*N,N*-dimethyl-3-oxo-1-propanaminiumchlorid (**36b**, 253 mg, 1.10 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert. Nach Zusatz von Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wird bei 140 °C Blocktemperatur im Parallelsynthesereaktor gerührt. Sobald dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar ist, wird der Reaktionsansatz heiß filtriert. Nach der Heißfiltration werden jeweils zwei Ansätze der Parallelsynthese vereinigt. Dem Filtrat wird Kieselgel (1.5 g) zugefügt und die Suspension wird im Vakuum eingeeengt. Der zurückbleibende Feststoff wird auf eine 3.5 cm dicke Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgetragen. Unter Einsatz von Vakuum wird mit Ethylacetat (700 mL bis 800 mL) eluiert, welches anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft wird. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (AAV 2): Synthese der Paullon-Zimtsäureamid-Hybride **24c**, **f-h**, **j** und **25 a-e**

9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol), die angegebene Menge des entsprechenden Acrylamids **40b-i**, **n** bzw. **m**, Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) werden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Sobald dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden kann, wird der Ansatz heiß filtriert. Nach Zugabe von Kieselgel (1.5 g) wird das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird auf eine 3.5 cm hohe Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgebracht. Mit einem angegebenen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch und Volumen wird unter Einsatz von Vakuum eluiert. Die organische Phase wird unter Vakuum eingeeengt und der Rückstand aus dem angegebenen Lösungsmittel umkristallisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 3 (AAV 3): Synthese der Acrylamide **40a-j**

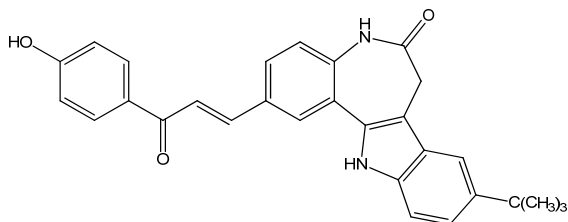
Die jeweilige Menge des entsprechenden Amins (**39a-j**) und eine äquimolare Menge Kaliumcarbonat werden in Wasser (2.5 mL) und Aceton (2.5 mL) im Eisbad auf unter 5 °C gekühlt. Die angegebene Menge Acrylsäurechlorid wird langsam unter Rühren innerhalb von 10 min zugetropft. Anschließend lässt man den Reaktionsansatz bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Das Volumen wird am Rotationsverdampfer auf die Hälfte eingengt. Der Feststoff wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

9-*tert*-Butyl-2-[(1*E*)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**17e**)

Nach AAV 1 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 860 mg, 2.00 mmol) und *N,N*-Dimethyl-3-oxo-3-phenyl-1-propanaminiumchlorid (**36a**, 468 mg, 2.20 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 475 mg (55%) eines orangenen Pulvers erhalten.

Schmp.: 276-279 °C (Lit.⁶⁹: 276 °C)

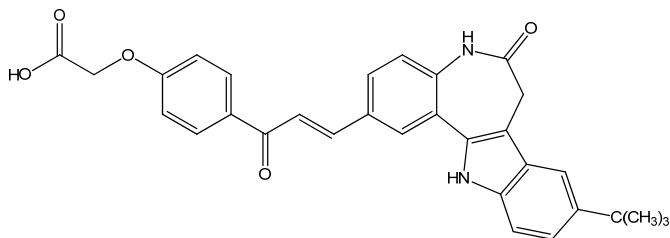
9-*tert*-Butyl-2-[(1*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo-[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**17f**)



Nach AAV 1 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 860 mg, 2.00 mmol) und 3-(4-Hydroxyphenyl)-*N,N*-dimethyl-3-oxo-1-propanaminiumchlorid (**36b**; 506 mg, 2.20 mmol). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 488 mg (54%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 264-266 °C (Lit.⁶⁹: 264 °C)

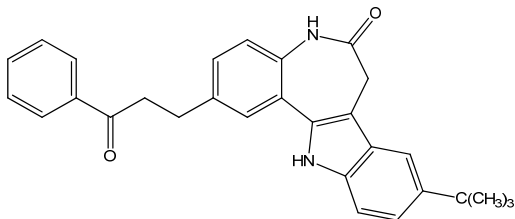
{4-[(2*E*)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)prop-2-enoyl]phenoxy}essigsäure (**20**)



{4-[(2*E*)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)prop-2-enoyl]phenoxy}essigsäureethylester (**45**; 100 mg, 0.186 mmol) wurde in Dichlormethan/Methanol (9:1) (10 mL) gelöst. Nach Zusatz von methanolischer Natriumhydroxid-Lösung (1 Mol/L) (1 mL) wurde bei Raumtemperatur gerührt. Sobald sich das Edukt laut DC-Kontrolle komplett umgesetzt hatte, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Feststoff wurde in Wasser aufgenommen und mit 10%iger Salzsäure angesäuert (Überprüfung mittels pH-Papier). Der Rückstand wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach dem Aufkochen in Ethanol wurden 75 mg (79%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 313-314 °C (Zers.); IR (KBr): 3389 cm⁻¹ (OH), 2952 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1714 cm⁻¹ (C=O), 1656 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.1 MHz): δ (ppm) = 1.38 (s, 9H, CH₃), 3.59 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.84 (s, 2H, CH₂), 7.09 - 7.12 (m, 2H, ArH), 7.29 - 7.31 (m, 2H, ArH), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.63 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.77 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz, Vinyl-H), 7.89 (dd, 1H, *J* = 1.8/8.6 Hz, ArH), 7.97 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz, Vinyl-H), 8.16 - 8.18 (m, 2H, ArH), 8.21 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 10.31 (s, 1H, NH), 11.48 (s, 1H, NH), 13.71 (s, breit, 1H, COOH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.7 (Azepin CH₂), 31.8 (3x CH₃), 64.6 (CH₂); 111.0, 113.6, 114.6 (2C), 120.7, 121.4, 122.5, 127.5, 128.1, 130.7 (2C), 142.6 (tert. C); 34.4, 107.7, 123.1, 126.3, 130.1, 130.9, 132.0, 135.7, 136.9, 141.6, 161.7, 169.7, 171.4, 187.3 (quart. C); C₃₁H₂₈N₂O₅ (508.57); MS (EI): *m/z* (%) = 508 [M]⁺ (68); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 508.19927; gef. 508.20025; HPLC: 97.1% bei 254 nm und 97.2% bei 280 nm, *t*_N = 3.21 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/Ameisensäure 0.05% 55:45), λ_{max}: 227 nm und 325 nm.

9-tert-Butyl-2-(3-oxo-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (21)

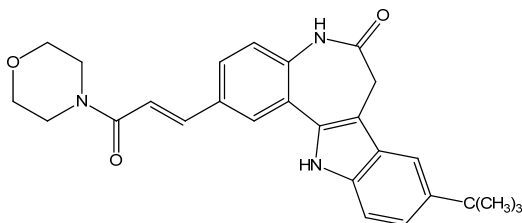


9-tert-Butyl-2-[(1*E*)-3-oxo-3-phenylprop-1-enyl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**17e**; 485 mg, 1.12 mmol) und Zinkstaub (742 mg, 11.2 mmol) wurden in Essigsäure (15 mL) 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz filtriert und der Filterkuchen dreimal mit Ethylacetat (20 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Feststoff wurde zweimal säulenchromatographisch gereinigt. Zuerst wurde ein Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (1+1 Teile) als Elutionsmittel verwendet. Anschließend erfolgte die zweite säulenchromatographische Reinigung des gewonnenen Feststoffs mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (2+1 Teile) als Elutionsmittel. Es wurden 67 mg (14%) eines weißen Pulvers erhalten.

Schmp.: 270-271 °C; IR (KBr): 3284 cm⁻¹ (NH), 2958 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1691 cm⁻¹ (C=O), 1646 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.36 (s, 9H, CH₃), 3.01 (t, 2H, *J* = 7.53 Hz, CH₂), 3.47 (t, 2H, *J* = 7.53 Hz, CH₂, teilweise überlagert vom H₂O-Peak), 3.48 (s, 2H, Azepin CH₂), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.28 Hz, ArH), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.66/1.89 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.28/2.07 Hz, ArH), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8.66/0.56 Hz, ArH), 7.52 - 7.55 (m, 2H, ArH), 7.59 (dd, 1H, *J* = 1.69 Hz, ArH), 7.63 - 7.66 (m, 2H, ArH), 8.01 - 8.03 (m, 2H, ArH), 10.01 (s, 1H, NH), 11.40 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.9 (CH₂), 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 39.4 (CH₂); 110.9, 113.3, 120.3, 122.1, 126.4, 127.9 (2C), 128.0, 128.7 (2C), 133.1 (tert. C); 34.3, 107.4, 122.8, 126.2, 132.6, 133.3, 135.5, 136.5, 136.5, 141.4, 171.4, 199.0 (quart. C); C₂₉H₂₈N₂O₂ (436.55); ber. C 79.79, H 6.46, N 6.42; gef. C 79.77, H 6.40 N 6.14; MS (EI): *m/z* (%) = 436 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 436.21453; gef. 436.21493; HPLC: 97.4% bei 254 nm und 94.6% bei

280 nm, $t_N = 5.93$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max} : 234 nm , 317 nm und 395 nm.

9-*tert*-Butyl-2-[(1*E*)-3-(morpholin-4-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (24a)

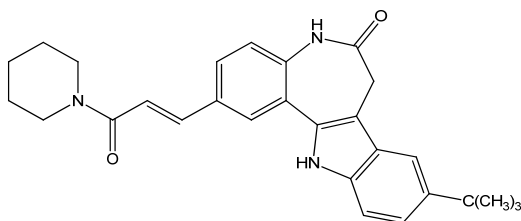


9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol), 4-Acryloylmorpholin (630 μ L, 5.00 mmol), Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in *N,N*-Dimethylformamid suspendiert (5 mL) und bei 150 °C unter Stickstoffbegasung 30 min lang erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde heiß filtriert. Nachdem man dem Filtrat Kieselgel (1.5 g) zugesetzt hatte, wurde es am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde auf eine 3.5 cm hohe Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgebracht und unter Einsatz von Vakuum mit Ethylacetat (500 mL) eluiert. Anschließend wurde die Ethylacetatphase im Vakuum eingeeengt. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol wurden 89 mg (40%) eines gelblichweißen Pulvers erhalten.

Schmp.: 293-294 °C (Zers.); IR (KBr): 3434 cm^{-1} (NH), 2963 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1669 cm^{-1} (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.56 (s, 2H, Azepin CH₂) überlagert von 3.56 - 3.75 (m, 8H, CH₂), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.7/1.9 Hz, ArH) überlagert von 7.29 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, Vinyl-H), 7.39 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.58 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, Vinyl-H), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, ArH), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.5/2.1 Hz, ArH), 8.04 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 10.26 (s, 1H, NH), 11.46 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.51 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 42.0 (CH₂), 45.5 (CH₂), 66.1 (CH₂), 66.3 (CH₂); 110.9, 113.5, 117.0, 120.5, 122.3, 126.6, 127.2, 141.0 (tert. C); 34.3, 107.6, 122.9, 126.1, 130.3, 132.0, 135.6, 136.1, 141.5, 164.4, 171.3 (quart. C);

C₂₇H₂₉N₃O₃ (443.54); MS (EI): m/z (%) = 443 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 443.22034; gef. 443.22011; HPLC: 98.3% bei 254 nm und 98.5% bei 280 nm, t_N = 5.76 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O 45:55), λ_{max}: 306 nm.

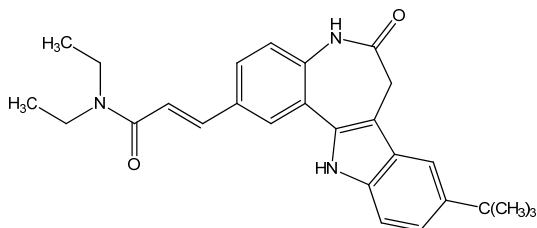
9-tert-Butyl-2-[(1E)-3-oxo-3-(piperidin-1-yl)prop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-d]-[1]benzazepin-6(5H)-on (**24b**)



9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 108 mg, 0.251 mmol), 1-Acryloylpiperidin (**40a**; 174 mg, 1.25 mmol), Palladium(II)acetat (11.0 mg, 0.0490 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff 45 min lang gerührt. Der Reaktionsansatz wurde heiß filtriert und unter Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 27 mg (24%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 277-278 °C (Zers.); IR (KBr): 3429 cm⁻¹ (NH), 3194 cm⁻¹ (NH), 2949 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1668 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.49 - 1.55 (m, 4H, CH₂), 1.61 - 1.65 (m, 2H, CH₂), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂) überlagert von 3.55 - 3.68 (m, 4H, CH₂), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.47 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 6.8/1.7 Hz, ArH) überlagert mit 7.30 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, Vinyl-H), 7.39 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, Vinyl-H), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.9 Hz, ArH), 8.03 (d, 1H, ArH), 10.25 (s, 1H, NH), 11.46 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 24.1 (CH₂), 25.4 (CH₂), 26.5 (CH₂), 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 42.5 (CH₂), 46.0 (CH₂); 110.9, 113.4, 117.7, 120.5, 122.3, 126.4, 127.2, 140.4 (tert. C); 34.3, 107.5, 122.9, 126.1, 130.5, 132.0, 135.6, 135.9, 141.5, 164.0, 171.3 (quart. C); C₂₈H₃₁N₃O₂ (441.57); MS (EI): m/z (%) = 441 [M]⁺ (100) HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 441.24108; gef. 441.24040; HPLC: 97.9% bei 254 nm und 98.2% bei 280 nm, t_N = 6.04 min, t_M = 1.02 min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max}: 306 nm.

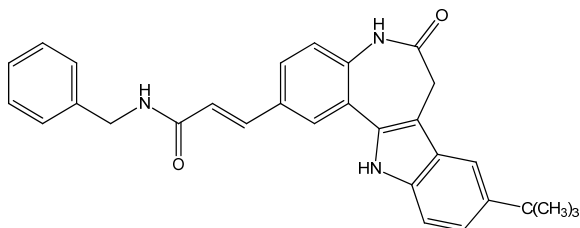
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N,N*-diethylacrylamid (**24c**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und Diethylacrylamid (**40m**, 63 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 71 mg (33%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 286-288 °C (Zers.); IR (KBr): 3200 cm⁻¹ (NH), 2962 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1667 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.09 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 1.19 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.40 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 3.54 (q, 2H, *J* = 7.0 Hz, CH₃) überlagert von 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 7.14 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, Vinyl-H), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.7/1.9 Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.56 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, Vinyl-H), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, ArH), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.9 Hz, ArH), 7.99 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 10.25 (s, 1H, NH), 11.47 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 13.2 (CH₃), 15.2 (CH₃), 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 40.1 (CH₂), 41.4 (CH₂), 111.0, 113.5, 118.0, 120.5, 122.4, 126.7, 127.0, 140.3 (tert. C); 34.3, 107.6, 122.9, 126.2, 130.5, 132.05, 135.6, 136.0, 141.5, 164.5, 171.3 (quart. C); C₂₇H₃₁N₃O₂ (429.55); MS (EI): *m/z* (%) = 429 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 429.24108; gef. 429.24124; HPLC: 97.8% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, *t*_N = 7.03 min, *t*_M = 1.02 min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max}: 305 nm.

(2E)-N-Benzyl-3-(9-tert-butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)acrylamid (24d)

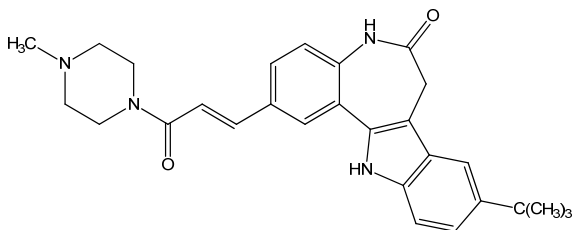


9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und Benzylacrylamid (**40i**; 161 mg, 1.00 mmol), Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Der Ansatz wurde heiß filtriert, wenn dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert wurde. Nach Zugabe von Kieselgel (1.5 g) wurde das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde auf eine 3.5 cm hohe Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgebracht und mit Ethylacetat (600 mL) eluiert. Die Ethylacetatphase wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Feststoff wurde mit Ethylacetat und Kieselgel (1.5 g) versetzt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (1:1) als Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 15-20 cm gereinigt. Die gewünschten Fraktionen wurden nach Entfernen des Elutionsmittels aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 62 mg (27%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 270-271 °C (Zers.); IR (KBr): 3416 cm⁻¹ (NH), 2952 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.43 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, NCH₂), 6.75 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.25 - 7.31 (m, 5H, ArH), 7.34 - 7.38 (m, 3H, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, Vinyl-H), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.7/2.0 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.94 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 8.69 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 10.27 (s, 1H, NH), 11.52 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 42.2 (CH₂), 110.9, 113.5, 120.6, 121.4, 122.5, 126.2, 126.3, 126.8, 127.3 (2C), 128.3 (2C), 138.1 (tert. C); 34.3, 107.7, 123.1, 126.2, 130.1, 132.0, 135.7, 136.0, 139.3, 141.6, 164.9, 171.4 (quart. C); C₃₀H₂₉N₃O₂ (463.57); MS (EI): *m/z* (%) = 463 [M]⁺ (100);

HRMS (EI): m/z $[M]^+$ ber. 463.22543; gef. 463.22563; HPLC: 98.3% bei 254 nm und 94.4% bei 280 nm, $t_N = 3.43$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O 60:40), λ_{\max} : 306 nm.

9-tert-Butyl-2-[(1E)-3-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-oxopropen-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**24e**)

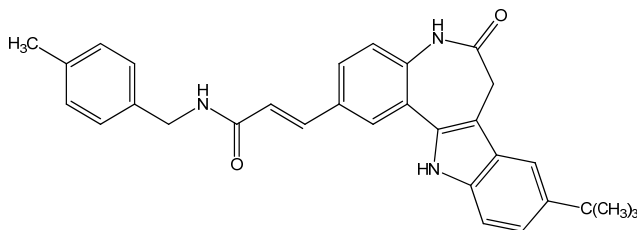


9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol), 1-Acryloyl-4-methylpiperazin (**40k**, 77 mg, 0.50 mmol), Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff 1 Stunde lang gerührt. Der Reaktionsansatz wurde heiß filtriert. Nach dem Abkühlen goss man das Filtrat in 4N Natronlauge (20 mL). Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 72 mg (31%) eines weißgelblichen Pulvers erhalten.

Schmp.: 276-277 °C; IR (KBr): 3429 cm⁻¹ (NH), 2951 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1649 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 2.21 (s, 3H, NCH₃), 2.31 - 2.36 (m, 4H, CH₂), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 3.58 - 3.73 (m, 4H, CH₂), 7.25 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, $J = 8.7/1.7$, ArH) teilweise überlagert von 7.30 (d, 1H, $J = 15.3$ Hz, Vinyl-H), 7.39 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.55 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, Vinyl-H), 7.61 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, ArH), 7.73 (dd, 1H, $J = 8.5/1.9$ Hz, ArH), 8.03 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 10.25 (s, 1H, NH), 11.45 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 41.5 (CH₂), 44.9 (CH₂), 45.5 (CH₃), 54.3 (CH₂), 55.1 (CH₂); 110.9, 113.5, 117.4, 120.5, 122.3, 126.5, 127.2, 140.8 (tert. C); 34.3, 107.6, 122.9, 126.2, 130.4, 132.1, 135.6, 136.0, 141.5, 164.3, 171.3 (quart. C); C₂₈H₃₂N₄O₂ (456.58); MS (EI): m/z (%) = 456 $[M]^+$ (70); HRMS (EI): m/z $[M]^+$ ber. 456.25198; gef. 456.25164; HPLC: 99.3%

bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, $t_N = 3.44$ min, $t_M = 1.02$ min (ACN/Puffer (pH = 2.7) 35:65), λ_{\max} : 308 nm.

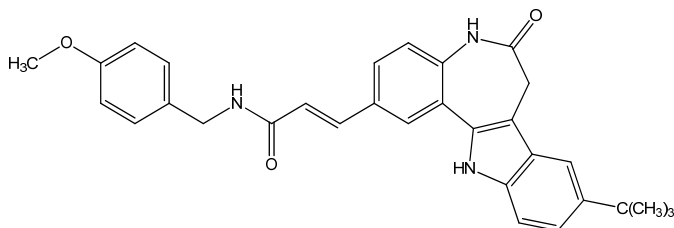
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(4-methylbenzyl)acrylamid (**24f**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(4-Methylbenzyl)acrylamid (**40g**; 88 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (200 mL). Nach zweimaliger Umkristallisation aus einem Ethanol/Wasser-Gemisch (17+6 Teile) und einem Toluol/Ethanol-Gemisch (9+1 Teile) wurden 11 mg (5%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 296-297 °C (Zers.); IR (KBr): 3310 cm^{-1} (NH), 2958 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1668 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 2.28 (s, 3H, CH₃), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.37 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, HNCH₂), 6.74 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, Vinyl-H), 7.14 - 7.15 (m, 2H, ArH), 7.18 - 7.20 (m, 2H, ArH), 7.26 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, $J = 8.7/1.9$ Hz, ArH), 7.37 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, ArH), 7.52 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, Vinyl-H), 7.5 (dd, 1H, $J = 8.5/1.9$ Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, ArH), 7.93 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 8.64 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, NH), 10.27 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.6 (CH₃), 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 42.0 (CH₂); 110.9, 113.5, 120.6, 121.5, 122.5, 126.1, 126.7, 127.2 (2C), 128.8 (2C), 138.0 (tert. C); 34.3, 107.7, 123.1, 126.2, 130.1, 132.0, 135.7, 135.8, 136.0, 136.3, 141.6, 164.8, 171.4 (quart. C); C₃₁H₃₁N₃O₃ (477.60); MS (EI): m/z (%) = 477 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 477.24108; gef. 477.24162; HPLC: 94.8% bei 254 nm und 94.6% bei 280 nm, $t_N = 4.01$ min, $t_M = 1.03$ min (ACN/H₂O 60:40), λ_{\max} : 303 nm.

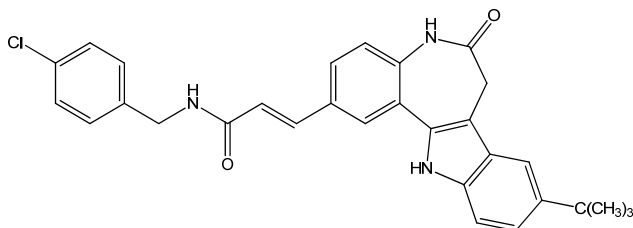
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(4-methoxybenzyl)acrylamid (**24g**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(4-Methoxybenzyl)acrylamid (**40h**, 97 mg, 0.51 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (200 mL). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol 70% und einem Toluol/Ethanol-Gemisch (9 + 1 Teile) wurden 36 mg (15%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 278-279 °C (Zers.); IR (KBr): 3442 cm⁻¹ (NH), 2954 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1662 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 4.35 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, HNCH₂), 6.72 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, Vinyl-H), 7.26 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.7 Hz, ArH), 6.89 - 6.92 (m, 2H, ArH), 7.22 - 7.24 (m, 2H, ArH), 7.37 (dd, 1H, *J* = 8.5/0.6 Hz, ArH), 7.52 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.9 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.93 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 8.61 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 10.27 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 41.7 (CH₂), 55.0 (OCH₃); 110.9, 113.5, 113.6 (2C), 120.6, 121.5, 122.5, 126.1, 126.7, 128.6 (2C), 138.0 (tert. C); 34.3, 107.7, 123.1, 126.2, 130.1, 131.3, 132.0, 135.7, 136.0, 141.6, 158.2, 164.7, 171.4 (quart. C); C₃₁H₃₁N₃O₃ (493.60); ber. C 75.43, H 6.30, N 8.51; gef. C 75.06, H 5.97, N 8.10; MS (EI): *m/z* (%) = 493 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 493.23599; gef. 493.23643; HPLC: 92.1% bei 254 nm und 97.0% bei 280 nm, *t*_N = 2.74 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 307 nm.

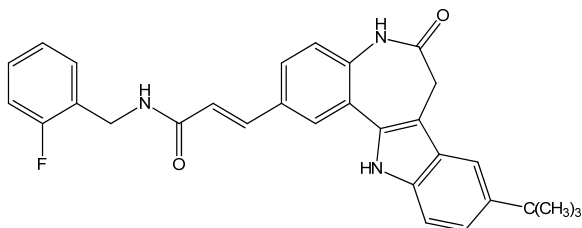
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(4-chlorbenzyl)acrylamid (**24h**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(4-Chlorbenzyl)acrylamid (**40i**, 98 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (200 mL). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol 70% und einem Toluol/Ethanol-Gemisch (9 + 1 Teile) wurden 27 mg (11%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 278-279 °C (Zers.); IR (KBr): 3418 cm⁻¹ (NH), 2955 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.56 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.41 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, HNCH₂), 6.73 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.27 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, *J* = 8.7/1.9 Hz, ArH), 7.31 - 7.34 (m, 2H, ArH), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.40 - 7.42 (m, 2H, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.9 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, ArH), 7.94 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 8.73 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH), 10.28 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 41.6 (CH₂); 110.9, 113.5, 120.6, 121.3, 122.5, 126.2, 126.8, 128.2 (2C), 129.1 (2C), 138.3 (tert. C); 34.3, 107.7, 123.1, 126.2 (überlagert von einem tertiären C), 130.0, 131.3, 132.0, 135.7, 136.0, 138.5, 141.6, 165.0, 171.4 (quart. C); C₃₀H₂₈ClN₃O₂ (498.02); ber. C 72.35, H 5.67, N 8.44; gef. C 71.95, H 5.51, N 8.19; MS (EI): *m/z* (%) = 497 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 497.18646; gef. 497.18613; HPLC: 96.3% bei 254 nm und 96.1% bei 280 nm, *t*_N = 4.30 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 305 nm.

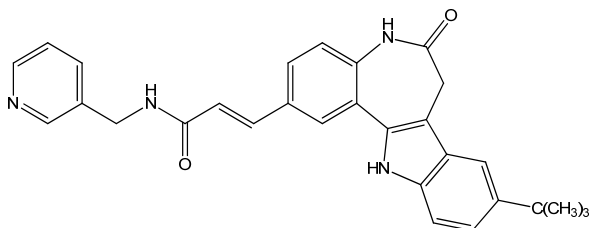
(2E)-3-(9-tert-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)-N-(2-fluorbenzyl)acrylamid (**24i**)



9-tert-Butyl-2-iodo-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol), N-(2-Fluorbenzyl)acrylamid (**40j**, 90 mg, 0.50 mmol), Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in N,N-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff 60 min lang gerührt. Der Reaktionsansatz wurde heiß filtriert und unter Vakuum zur Trockne eingengt. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol 70% und einem Toluol/Ethanol-Gemisch (5 + 2 Teile) wurden 59 mg (25%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 243-244 °C (Zers.); IR (KBr): 3280 cm⁻¹ (NH), 2954 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1655 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.56 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.46 (d, 2H, J = 5.8 Hz, HNC_H2), 6.75 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.18 - 7.22 (m, 2H, ArH), 7.27 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.29 (dd, 1H, J = 8.7/1.9 Hz, ArH), 7.31 - 7.39 (m, 3H, ArH), 7.52 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.56 (dd, 1H, J = 8.5/1.9 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 7.94 (d, 1H, J = 2.0 Hz, ArH), 8.69 (t, 1H, J = 5.8 Hz, NH), 10.28 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 36.2 (d, ³J_{C,F} = 4.2 Hz, CH₂-C-C-F); 110.9, 113.5, 115.1 (d, ²J_{C,F} = 20.9 Hz, C-C-F), 120.6, 121.2, 122.5, 124.3 (d, ⁴J_{C,F} = 3.3 Hz, C-C-C-C-F), 126.2, 126.7, 129.0 (d, ³J_{C,F} = 8.2 Hz, C-C-C-F), 129.7 (d, ³J_{C,F} = 4.2 Hz, C-C-C-F), 138.3 (tert. C); 34.3, 107.7, 123.1, 125.9 (d, ²J_{C,F} = 14.8 Hz, C-C-F), 130.0, 132.0, 135.7, 136.0, 141.6, 160.0 (d, ¹J_{C,F} = 244.6 Hz, C-F), 165.0, 171.4 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 512 Scans); C₃₀H₂₈FN₃O₂ (481.56); MS (EI): m/z (%) = 481 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 481.21601; gef. 481.21454; HPLC: 97.5% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm, t_N = 3.14 min, t_M = 1.04 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 308 nm.

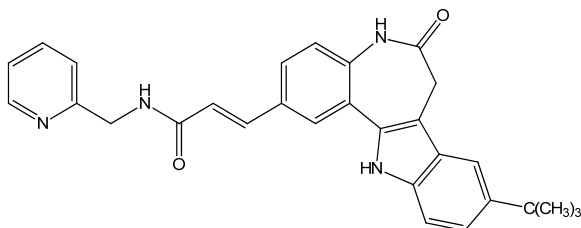
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(pyridin-3-ylmethyl)acrylamid (**24j**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(Pyridin-3-ylmethyl)acrylamid (**40n**, 81 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Aceton (400 mL). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Aceton wurden 47 mg (20%) eines weißbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 254-255 °C (Zers.); IR (KBr): 3428 cm⁻¹ (NH), 2953 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1667 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.4 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.55 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.45 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, HNCCH₂), 6.72 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, Vinyl-H), 7.25 - 7.30 (m, 2H, ArH), 7.36 - 7.40 (m, 2H, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, Vinyl-H) überlagert 7.57 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.8 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.70 - 7.73 (m, 1H, ArH), 7.94 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 8.48 (dd, 1H, *J* = 4.8/1.5 Hz, ArH), 8.54 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 8.75 (t, 1H, *J* = 6.0 Hz, NH), 10.26 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.7 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.8 (3x CH₃), 39.5 (CH₂); 111.0, 113.5, 120.6, 121.3, 122.6, 123.5, 126.3, 126.9, 135.2, 138.4, 148.1, 148.8 (tert. C); 34.4, 107.8, 123.1, 130.1, 132.1, 135.0, 135.8, 136.1, 141.6, 165.1, 171.4 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₂₉H₂₈N₄O₂ (464.56); MS (EI): *m/z* (%) = 464 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 464.22068; gef. 464.22021; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, *t*_N = 2.83 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max}: 306 nm.

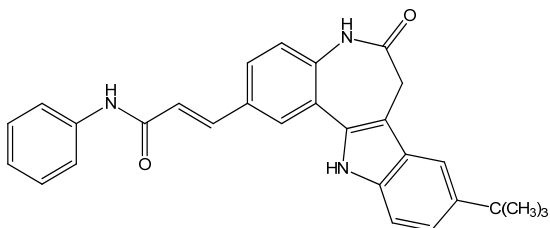
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)acrylamid (**24k**)



9-*tert*-Butyl-2-iodo-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol), *N*-(Pyridin-2-ylmethyl)acrylamid (**40o**, 81 mg, 0.50 mmol), Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert und bei 150 °C unter Stickstoff 50 min gerührt. Der Reaktionsansatz wurde heiß filtriert und nach Zugabe von Kieselgel (1.5 g) unter Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Aceton (1:1) als Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 15-20 cm gereinigt. Die gewünschten Fraktionen wurden nach Entfernen des Elutionsmittels aus Aceton zweimal umkristallisiert. Es wurden 52 mg (22%) eines weißbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 210-211 °C (Zers.); IR (KBr): 3397 cm⁻¹ (NH), 2957cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1661 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.4 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.56 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.52 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, HNCCH₂), 6.81 (d, 1H, *J* = 15.8 Hz, Vinyl-H), 7.26 - 7.30 (m, 3H, ArH), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, ArH), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.53 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.8 Hz, ArH), 7.61 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 7.78 (dt, 1H, *J* = 7.8/1.8 Hz, ArH), 7.95 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 8.53 (m, 1H, ArH), 8.75 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH), 10.26 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.7 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 44.4 (CH₂); 111.0, 113.5, 120.6, 121.1, 122.1, 122.6, 126.3, 126.8, 132.1, 136.7, 138.8, 148.9 (tert. C); 34.4, 107.8, 123.1, 126.3 (überlagert von einem tert. C), 130.2, 135.8, 136.1, 141.6, 158.5, 165.1, 171.4 (quart. C, ein C nicht detektiert bei 960 Scans); C₂₉H₂₈N₄O₂ (464.56); MS (EI): *m/z* (%) = 464 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 464.22068; gef. 464.22073; HPLC: 98.1% bei 254 nm und 98.6% bei 280 nm, *t*_N = 5.76 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 45:55), λ_{max}: 304 nm.

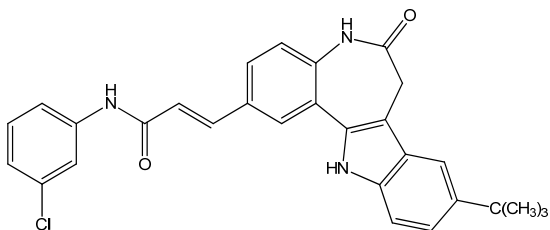
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-phenylacrylamid (**25a**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-Phenylacrylamid (**40b**, 74 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 122 mg (54%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 295-296 °C (Zers.); IR (KBr): 3262 cm⁻¹ (NH), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1668 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.57 (s, 2H, Azepin CH₂), 6.90 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.06 - 7.09 (m, 1H, ArH), 7.30 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.33 - 7.36 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.62 - 7.66 (m, 3H, Vinyl-H, ArH), 7.73 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, ArH), 8.01 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 10.29 (s, 1H, NH), 10.33 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃); 111.0, 113.5, 119.1 (2C), 120.6, 121.5, 122.6, 123.3, 126.4, 127.0, 128.7 (2C), 139.3 (tert. C); 34.3, 107.8, 123.1, 126.2, 129.9, 132.0, 135.7, 136.3, 139.3 (teilweise überlagert von einem tert. C), 141.6, 163.5, 171.4 (quart. C); C₂₉H₂₇N₃O₂ (449.54); MS (EI): *m/z* (%) = 449 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 449.20978; gef. 449.20952; HPLC: 97.6% bei 254 nm und 98.1% bei 280 nm, *t*_N = 4.67 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 55:45), λ_{max}: 310 nm.

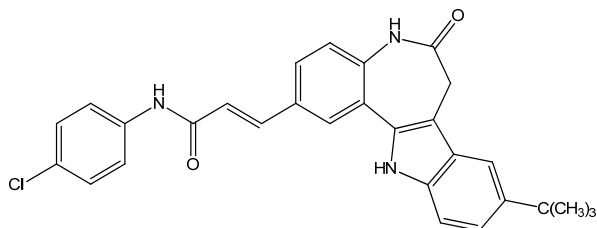
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(3-chlorphenyl)acrylamid (**25b**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(3-Chlorphenyl)acrylamid (**40c**, 91 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach zweimaliger Umkristallisation aus Ethanol wurden 19 mg (8%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 283-284 °C (Zers.); IR (KBr): 3423 cm⁻¹ (NH), 2955 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1666 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.58 (s, 2H, Azepin CH₂), 6.86 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.13 - 7.15 (m, 1H, ArH), 7.29 - 7.31 (m, 2H, ArH), 7.36 - 7.39 (m, 2H, ArH), 7.54 - 7.56 (m, 1H, ArH), 7.62 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, ArH), 7.64 (dd, 1H, *J* = 8.5/1.9 Hz, ArH), 7.67 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.98 (t, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 8.01 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 10.33 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃); 110.9, 113.5, 117.5, 118.5, 120.6, 121.0, 122.6, 123.0, 126.5, 127.0, 130.5, 140.0 (tert. C); 34.3, 107.8, 123.1, 126.2, 129.7, 132.0, 133.1, 135.8, 136.4, 140.7, 141.6, 163.8, 171.4 (quart. C); C₂₉H₂₆ClN₃O₂ (483.99); MS (EI): *m/z* (%) = 483 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 483.17081; gef. 483.17104; HPLC: 97.8% bei 254 nm und 97.6% bei 280 nm, *t*_N = 5.21 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 314 nm.

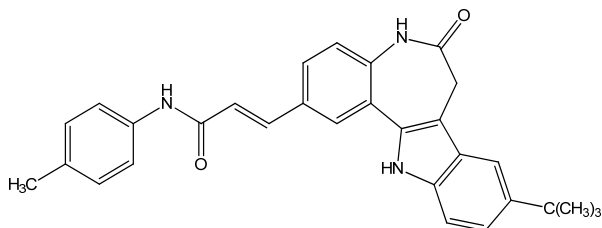
(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)-*N*-(4-chlorphenyl)acrylamid (**25c**)



Nach AAV 2 aus 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und *N*-(4-Chlorphenyl)acrylamid (**40d**, 91 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 142 mg (59%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 316-317 °C (Zers.); IR (KBr): 3368 cm⁻¹ (NH), 2952 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1657 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.57 (s, 2H, Azepin CH₂), 6.87 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.29 - 7.30 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, ArH), 7.40 - 7.42 (m, 2H, ArH), 7.62 - 7.64 (m, 2H, ArH), 7.66 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.75 - 7.77 (m, 2H, ArH), 8.01 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 10.33 (s, 1H, NH), 10.43 (s, 1H, NH), 11.54 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃); 110.9, 113.5, 120.6 (2C), 121.2, 122.6, 126.5, 127.0, 128.7 (2C), 139.7 (tert. C; ein tertiäres C wird wahrscheinlich von dem Signal bei 120.6 ppm überlagert); 34.3, 107.8, 123.1, 126.2, 126.8, 129.7, 132.0, 135.7, 136.3, 138.2, 141.6, 163.6, 171.4 (quart. C); C₂₉H₂₆ClN₃O₂ (483.99); MS (EI): *m/z* (%) = 483 [M]⁺ (100); HRMS (EI): *m/z* [M]⁺ ber. 483.17081; gef. 483.17084; HPLC: 95.8% bei 254 nm und 96.7% bei 280 nm, *t*_N = 4.41 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 60:40), λ_{max}: 311 nm.

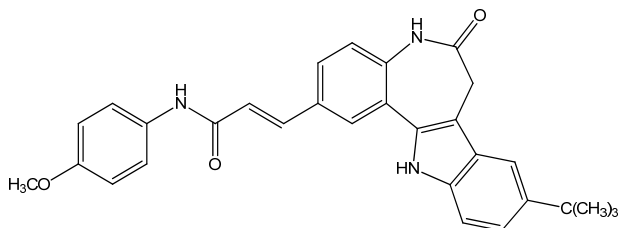
(2E)-3-(9-tert-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)-N-(4-methylphenyl)acrylamid (25d)



Nach AAV 2 aus 9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und N-(4-Methylphenyl)acrylamid (**40e**, 81 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 134 mg (58%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 336-337 °C (Zers.); IR (KBr): 3304 cm⁻¹ (NH), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1670 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃), 3.57 (s, 2H, Azepin CH₂), 6.88 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Vinyl-H), 7.15 (d, 2H, ArH), 7.29 - 7.30 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.61 - 7.64 (m, 5H, Vinyl-H, ArH), 7.99 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 10.20 (s, 1H, NH), 10.31 (s, 1H, NH) 11.54 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.4 (CH₃), 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃); 110.9, 113.5, 119.1 (2C), 120.6, 121.7, 122.6, 126.4, 126.9, 129.1 (2C), 139.0 (tert. C); 34.3, 107.8, 123.1, 120.6, 129.9, 132.0, 132.2, 135.7, 136.2, 136.6, 141.6, 163.3, 171.4 (quart. C); C₃₀H₂₉N₃O₂ (463.57); MS (EI): m/z (%) = 463 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 463.22543; gef. 463.22517; HPLC: 97.1% bei 254 nm und 97.8% bei 280 nm, t_N = 4.39 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O 55:45), λ_{max}: 311 nm.

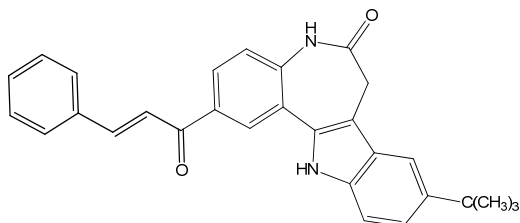
(2E)-3-(9-tert-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-2-yl)-N-(4-methoxyphenyl)acrylamid (25e)



Nach AAV 2 aus 9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und N-(4-Methoxyphenyl)acrylamid (**40f**, 89 mg, 0.50 mmol). Eluierung mit Ethylacetat (400 mL). Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 109 mg (46%) eines hellbeigen Pulvers erhalten.

Schmp.: 307-308 °C (Zers.); IR (KBr): 3195 cm⁻¹ (NH), 2956 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 1656 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.57 (s, 2H, Azepin CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 6.86 (d, 1H, J = 15.6 Hz, Vinyl-H), 6.91 - 6.94 (m, 2H, ArH), 7.28 - 7.30 (m, 2H, ArH), 7.39 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.60 - 7.62 (m, 3H, Vinyl-H, ArH), 7.63 - 7.66 (m, 2H, ArH), 7.99 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 10.16 (s, 1H, NH), 10.31 (s, 1H, NH), 11.54 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 55.1 (OCH₃); 110.9, 113.5, 113.9 (2C), 120.5 (2C), 120.6, 121.7, 122.6, 126.3, 126.9, 138.8 (tert. C); 34.3, 107.8, 123.1, 126.2, 130.0, 132.0, 132.4, 135.7, 136.2, 141.6, 155.2, 163.0, 171.4 (quart. C); C₃₀H₂₉N₃O₃ (479.57); MS (EI): m/z (%) = 479 [M]⁺ (100); HRMS (EI): m/z [M]⁺ ber. 479.22034; gef. 479.22034; HPLC: 98.3% bei 254 nm und 99.2% bei 280 nm, t_N = 4.95 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max}: 312 nm.

9-*tert*-Butyl-2-[(2*E*)-3-phenylprop-2-enoyl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (26)

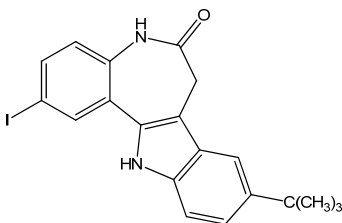


Benzaldehyd (**50**; 4 mL) wurde in einem Reagenzglas fünfmal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung (6 mL) gewaschen. 2-Acetyl-9-*tert*-butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**49**; 377 mg, 1.09 mmol) und der gereinigte Benzaldehyd (**50**; 440 μ L, 4.35 mmol) wurden in Ethanol (8 mL) unter Eiskühlung gerührt und mit einer 5.5%igen Kaliumhydroxid-Lösung versetzt bis der Ansatz einen pH-Wert von 9 aufwies. Die Mischung wurde 15 min im Eisbad und anschließend 8 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit 10%iger Salzsäure neutralisiert, mit Wasser (50 mL) versetzt und viermal mit Ethylacetat (60 mL) extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter Zugabe von Kieselgel (1.5 g) am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (1:1) als Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 25-30 cm gereinigt. Nach Entfernen des Elutionsmittels wurden 59 mg (12%) eines gelben Pulvers erhalten. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 11 mg (2%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 346-347 °C (Zers.); IR (KBr): 3274 cm^{-1} (NH), 2954 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1655 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) =: 1.38 (s, 9H, CH_3), 3.62 (s, 2H, Azepin CH_2), 7.31 (dd, 1H, $J = 8.7/1.9$ Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.42 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, ArH), 7.48 - 7.52 (m, 3H, ArH), 7.64 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, ArH), 7.83 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, Vinyl-H), 7.93 (dd, 2H, $J = 8.1/2.0$ Hz, ArH), 8.06 (d, 1H, $J = 15.6$, Vinyl-H), 8.15 (dd, 1H, $J = 8.7/2.1$ Hz, ArH), 8.53 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, ArH), 10.48 (s, 1H, NH), 11.65 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH_2), 31.7 (3x CH_3); 111.0, 113.5, 120.7, 121.9, 122.1, 127.7, 127.8, 128.8 (2C), 128.9 (2C), 130.6, 143.7 (tert. C); 34.3, 107.8, 122.6,

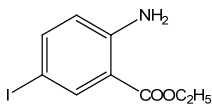
126.2, 131.7, 132.7, 134.6, 135.8, 139.0, 141.6, 171.4, 187.6 (quart. C); $C_{29}H_{26}N_2O_2$ (434.53); MS (EI): m/z (%) = 434 $[M]^+$ (92); HRMS (EI): m/z $[M]^+$ ber. 434.19888; gef. 434.19902; HPLC: 89.7 % bei 254 nm und 88.5% bei 280 nm, t_N = 3.35 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O 70:30), λ_{max} : 314 nm und 225 nm. Die Substanz enthält Verunreinigungen: 1.5% bei 254 nm und 1.8% bei 280 nm, t_N = 2.18 min; 2.7% bei 254 nm und 2.8% bei 280 nm, t_N = 2.67 min; 1.1% bei 254 nm und 1.5% bei 280 nm, t_N = 3.94 min.

9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (27)



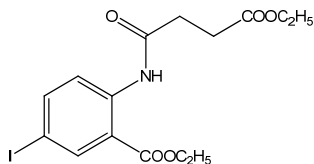
7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (**34**; 452 mg, 1.50 mmol), 1-(4-*tert*-Butylphenyl)hydrazin-Hydrochlorid (**35**; 401 mg, 2.00 mmol) und Natriumacetat (168 mg, 2.00 mmol) wurden in Eisessig (15 mL) bei 85 °C im Parallelsynthesereaktor 1 h lang erhitzt. Anschließend wurde konz. Schwefelsäure (0.1 mL) zugefügt und der Reaktionsansatz wurde eine weitere Stunde bei 85 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden vier Ansätze der Parallelsynthese vereinigt und in 5%ige Natriumacetat-Lösung (150 mL) gegossen und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 1.6 g (62%) hellgelbe Kristalle erhalten.

Schmp.: 313 - 320 °C (Zers.) (Lit.⁶⁹: 313 °C)

2-Amino-5-iodbenzoesäureethylester (30)

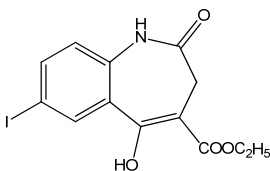
Eine Mischung aus 2-Amino-5-iodbenzoesäure (**28**; 13.2 g, 50.0 mmol) und wasserfreiem Kaliumcarbonat (13.8 g, 100 mmol) wurde in *N,N*-Dimethylformamid (80 mL) zunächst 30 min lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde zu dieser Mischung langsam eine Lösung aus Iodethan (**29**; 4.9 ml, 60 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (20 mL) zugetropft. Nachdem der Ansatz eine weitere Stunde bei Raumtemperatur rührte, goss man ihn in Eiswasser (400 mL). Der entstehende Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Nach Umkristallisation aus Petrolether wurden 8.4 g (58%) beige Kristalle erhalten.

Schmp.: 69-70 °C (Lit.⁸²: 69-70 °C)

2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**32**)

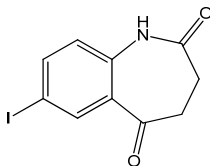
Eine Lösung aus 2-Amino-5-iodbenzoesäureethylester (**30**; 8.00 g, 27.5 mmol), Pyridin (3.2 mL) und Toluol (47 mL) wurde im Eisbad gerührt. Dieser gekühlten Lösung wurde tropfenweise eine Lösung aus Bernsteinsäureethylesterchlorid (**31**; 5.00 mL, 33.8 mmol) in Toluol (14 mL) zugefügt. Anschließend wurde 2 h bei 80 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde abgesaugt und der Niederschlag zweimal mit Ethylacetat (20 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde nacheinander mit 10%iger Salzsäure, 10%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 10.3 g (90%) weiße Kristalle erhalten.

Schmp.: 106 °C (Lit.⁹⁶: 106 °C)

5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (33)

Kaliumhydrid (35%ige Suspension in Mineralöl; 4.8 g) (Vorsicht: Kaliumhydrid entzündet sich sofort bei Kontakt mit Feuchtigkeit oder Wasser! Sand zum Löschen bereithalten! Metallkühler verwenden!) wurde unter Stickstoffbegasung zweimal mit getrocknetem Toluol (10 mL) gewaschen und dann in getrocknetem Toluol (50 mL) suspendiert. Eine Lösung aus 2-[(4-Ethoxy-4-oxobutanoyl)amino]-5-iodbenzoesäureethylester (**32**; 10.7 g, 25.4 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (5.1 mL) und getrocknetem Toluol (50 mL) wurde langsam über einen Tropftrichter zu der unter Stickstoff in einem vorgekühlten Silikonbad gerührten Suspension getropft. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde der Reaktionsansatz 2 h lang bei 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden vorsichtig zunächst Eisessig (5.1 mL) und dann Wasser (100 mL) zugefügt. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Wasser und Petrolether gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol/Toluol (1:1) wurden 7.9 g (84%) weiße Kristalle erhalten.

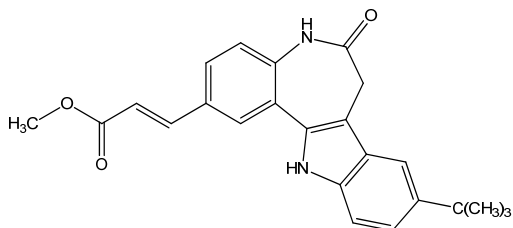
Schmp.: 253-254 °C (Zers.) (Lit.⁹⁶: 254 °C (Zers.))

7-Iod-3,4-dihydro-1*H*-1-benzazepin-2,5-dion (34)

Eine Lösung aus 5-Hydroxy-7-iod-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-1-benzazepin-4-carbonsäureethylester (**33**; 5.6 g, 15 mmol) und DMSO (150 mL) wurde mit Wasser (7.5 mL) versetzt und bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Nach 1 h und 3 h wurde nochmals Wasser (7.5 mL) zugefügt. Nach insgesamt 4 h ließ man den Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abkühlen und goss ihn in Wasser (300 mL). Nachdem das Gemisch 12 h im Kühlschrank aufbewahrt wurde, wurde der Niederschlag abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 3.5 g (77%) farblose Kristalle erhalten.

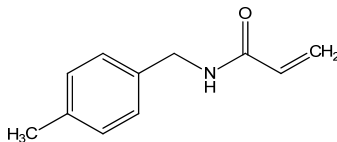
Schmp.: 217 °C (Lit.⁹⁶: 217 °C)

(2E)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)acrylsäuremethylester (38)



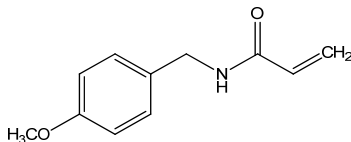
9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 215 mg, 0.500 mmol) und Acrylsäuremethylester (0.450 ml, 5.00 mmol) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert. Nach Zusatz von Palladium(II)acetat (11 mg, 0.049 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurde bei 150 °C unter Stickstoff gerührt. Sobald dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war, wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert. Nach der Heißfiltration wurde dem Filtrat Kieselgel (1.5 g) zugefügt und die Suspension wurde im Vakuum eingengt. Der zurückbleibende Feststoff wurde auf eine 3.5 cm dicke Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgetragen. Unter Einsatz von Vakuum wurde mit Ethylacetat (250 mL) eluiert, welches anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft wurde. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 86 mg (44%) eines weiß-gelben Feststoffs erhalten.

Schmp.: ab 305 °C (Zers.) (Lit.⁶⁹: 305 °C (Zers.))

N-(4-Methylbenzyl)acrylamid (40g)

Nach AAV 3 aus 4-Methylbenzylamin (**39g**; 1.04 mL, 8.12 mmol), Kaliumcarbonat (1.12 g, 8.12 mmol) und Acrylsäurechlorid (660 μ L, 8.12 mmol). Nach dem Trocknen wurden 1.1 g (76%) eines weißbeigen Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

Schmp.: 102-103 °C (Lit.¹²¹: 110-113.5 °C); IR (KBr): 3290 cm^{-1} (NH), 2925 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1655 cm^{-1} (C=O) $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.27 (s, 3H, CH₃), 4.30 (d, 2H, J = 5.8 Hz, HNCH_2), 5.61 (dd, 1H, J = 10.2/2.3 Hz, (C=O)C=CH), 6.12 (dd, 1H, J = 17.1/2.3 Hz, (C=O)C=CH), 6.28 (dd, 1H, J = 17.1/10.4 Hz, (C=O)CH=C), 7.12 - 7.16 (m, 4H, ArH), 8.58 (t, 1H, J = 5.3 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 20.6 (CH₃), 41.8 (NHCH₂), 125.2 (=CH₂); 127.3 (2C), 128.8 (2C), 131.6 (tert. C); 135.8, 136.1, 164.4 (quart. C).

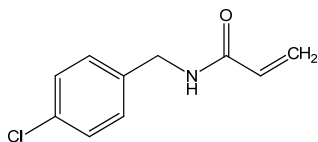
N-(4-Methoxybenzyl)acrylamid (40h)

Nach AAV 3 aus 4-Methoxybenzylamin (**39h**; 1.06 mL, 8.12 mmol), Kaliumcarbonat (1.12 g, 8.12 mmol) und Acrylsäurechlorid (660 μ L, 8.12 mmol). Nach dem Trocknen wurden 1.0 g (65%) eines hellgelben Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde. Die Verbindung **40h** wurde unabhängig von den in der Literatur¹²² angegebenen Daten charakterisiert.

Schmp.: 98-99 °C; IR (KBr): 3288 cm^{-1} (NH), 1654 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 3.27 (s, 3H, OCH₃), 4.28 (d, 2H, J = 6.0 Hz, HNCH_2), 5.60 (dd, 1H, J = 10.2/2.3 Hz, (C=O)C=CH), 6.12 (dd, 1H, J = 17.1/2.3 Hz, (C=O)C=CH),

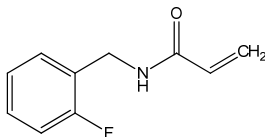
6.26 (dd, 1H, $J = 17.1/10.2$ Hz, (C=O)CH=C), 6.87 - 6.90 (m, 2H, ArH), 7.18 - 7.20 (m, 2H, ArH), 8.54 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.5 (NHCH₂), 55.0 (OCH₃), 125.2 (=CH₂); 113.6 (2C), 128.7 (2C), 131.6 (tert. C); 131.1, 158.2, 164.3 (quart. C).

N-(4-Chlorbenzyl)acrylamid (**40i**)



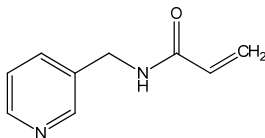
Nach AAV 3 aus 4-Chlorbenzylamin (**39i**; 0.989 mL, 8.12 mmol), Kaliumcarbonat (1.12 g, 8.12 mmol) und Acrylsäurechlorid (660 μL , 8.12 mmol). Nach dem Trocknen wurde 1.1 g (70%) eines hellbeigen Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde. Die Verbindung **40i** wurde unabhängig von den in der Literatur¹²² angegebenen Daten charakterisiert.

Schmp.: 95-96 °C ; IR (KBr): 3281 cm^{-1} (NH), 1652 cm^{-1} (C=O); ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.34 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, HNCH₂), 5.63 (dd, 1H, $J = 10.2/2.1$ Hz, (C=O)C=CH), 6.13 (dd, 1H, $J = 17.0/2.1$ Hz, (C=O)C=CH), 6.28 (dd, 1H, $J = 17.1/10.2$ Hz, (C=O)CH=C), 7.27 - 7.30 (m, 2H, ArH), 7.38 - 7.40 (m, 2H, ArH), 8.68 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, NH); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 41.4 (NHCH₂), 125.5 (=CH₂); 128.2 (2C), 129.1 (2C), 131.4 (tert. C); 131.3, 138.3, 164.6 (quart. C).

N-(2-Fluorbenzyl)acrylamid (40j)

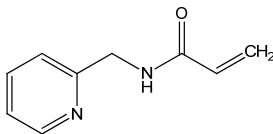
Nach AAV 3 aus 2-Fluorbenzylamin (**39j**; 0.466 mL, 4.06 mmol), Kaliumcarbonat (0.561 g, 4.06 mmol) und Acrylsäurechlorid (330 μ L, 4.06 mmol). Nach dem Trocknen wurden 0.32 g (44%) eines rosafarbenen Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

Schmp.: 72-73 °C; IR (KBr): 3279 cm^{-1} (NH), 1655 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.39 (d, 2H, J = 5.7 Hz, HNCH_2), 5.63 (dd, 1H, J = 10.2/2.1 Hz, (C=O)C=CH), 6.13 (dd, 1H, J = 17.1/2.3 Hz, (C=O)C=CH), 6.29 (dd, 1H, J = 17.1/10.2 Hz, (C=O)CH=C), 7.16 - 7.12 (m, 2H, ArH), 7.30 - 7.34 (m, 2H, ArH), 8.61 (t, 1H, J = 5.1 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 35.9 (d, $^3J_{\text{C,F}}$ = 4.5 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-C-C-F}}$), 125.5 (=CH₂); 115.0 (d, $^2J_{\text{C,F}}$ = 21.2 Hz, $\underline{\text{C-C-F}}$), 124.3 (d, $^4J_{\text{C,F}}$ = 3.3 Hz, $\underline{\text{C-C-C-F}}$), 129.0 (d, $^3J_{\text{C,F}}$ = 8.2 Hz, $\underline{\text{C-C-C-F}}$), 129.7 (d, $^3J_{\text{C,F}}$ = 4.2 Hz, $\underline{\text{C-C-C-F}}$), 131.3 (tert. C); 125.7 (d, $^2J_{\text{C,F}}$ = 14.8 Hz, $\underline{\text{C-C-F}}$), 160.0 (d, $^1J_{\text{C,F}}$ = 244.3 Hz, $\underline{\text{C-F}}$), 164.5 (quart. C).

N-(Pyridin-3-ylmethyl)acrylamid (**40n**)

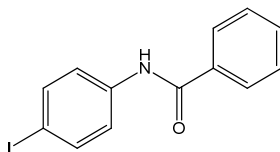
Eine Lösung aus Acrylsäurechlorid (0.812 mL, 10.0 mmol) in Dichlormethan (35 mL) wurde auf -10 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Mischung aus 3-(Aminomethyl)pyridin (**39n**; 1.02 mL, 10.0 mmol) und Triethylamin (1.39 mL) in Dichlormethan (5 mL) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 23 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Wasser (30 mL) aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Man erhielt 166 mg (10%) eines orangebraunen, klebrigen Feststoffs, der ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.38 (d, 2H, J = 6.0 Hz, HNCH_2), 5.63 (dd, 1H, J = 10.2/2.1 Hz, $(\text{C}=\text{O})\text{C}=\text{CH}$), 6.13 (dd, 1H, J = 17.1/2.1 Hz, $(\text{C}=\text{O})\text{C}=\text{CH}$), 6.27 (dd, 1H, J = 17.1/10.2 Hz, $(\text{C}=\text{O})\text{CH}=\text{C}$), 7.35 - 7.37 (ddd, 1H, J = 7.9/4.9/0.9, ArH), 7.65 - 7.67 (m, 1H, ArH), 8.47 (dd, 1H, J = 4.7/1.7 Hz, ArH), 8.47 (m, 1H, ArH), 8.76 (t, 1H, J = 5.1 Hz, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150.9 MHz): δ (ppm) = 39.8 (NHCH_2), 125.6 ($=\text{CH}_2$); 123.4, 131.3, 135.1, 148.1, 148.8 (tert. C); 134.7, 164.3 (quart. C).

N-(Pyridin-2-ylmethyl)acrylamid (**40o**)

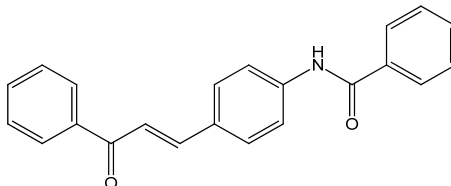
Eine Lösung aus Acrylsäurechlorid (0.812 mL, 10.0 mmol) in Dichlormethan (15 mL) wurde auf -10 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Mischung aus 2-(Aminomethyl)pyridin (**39o**; 1.04 mL, 10.0 mmol) und Triethylamin (1.39 mL) in Dichlormethan (5 mL) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Wasser (30 mL) aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Es wurden 647 mg (40%) eines orangebraunen klebrigen Feststoffs erhalten, der ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde. Die Verbindung **40o** wurde unabhängig von den in der Literatur⁸⁹ angegebenen Daten charakterisiert.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 4.45 (d, 2H, *J* = 6.0 Hz, HNCH₂), 5.64 (dd, 1H, *J* = 10.2/2.1 Hz, (C=O)C=CH), 6.14 (dd, 1H, *J* = 17.1/2.1 Hz, (C=O)C=CH), 6.34 (dd, 1H, *J* = 17.1/10.2 Hz, (C=O)CH=C), 7.26 - 7.28 (m, 2H, ArH), 7.77 (dt, 1H, *J* = 7.7/1.9, ArH), 8.51 (m, 1H, ArH), 8.71 (t, 1H, *J* = 5.3 Hz, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 44.1 (NHCH₂), 125.5 (=CH₂); 121.1, 122.1, 131.5, 136.7, 148.8 (tert. C); 158.3, 164.7 (quart. C).

N-(4-Iodphenyl)benzamid (**43**)

Eine Lösung aus Benzoesäureanhydrid (**42**; 6.8 g, 30 mmol) in Dichlormethan (10 mL) wurde unter Eiskühlung tropfenweise mit einer Lösung aus 4-Iodanilin (**41**; 2.2 g, 10 mmol) und Triethylamin (4.5 mL) in Dichlormethan (20 mL) versetzt. Nachdem der Reaktionsansatz 4 h lang refluxierte, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in heißem Dichlormethan (5 mL) suspendiert und das kristalline Produkt abgesaugt. Es wurden 2.8 g (87%) farblose Kristalle erhalten.

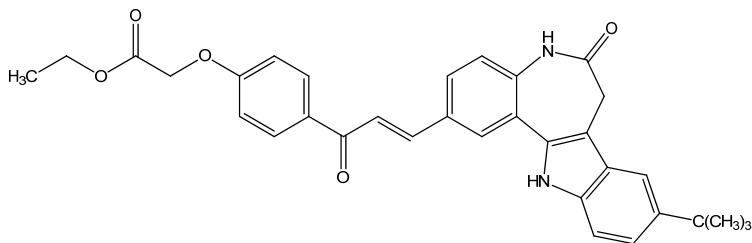
Schmp.: 219-221 °C (Lit.¹²³ 222 °C)

N-(4-[(1*E*)-3-Oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]-phenyl)benzamid (**44**)

N-(4-Iodophenyl)benzamid (**43**; 485 mg, 1.50 mmol) und *N,N*-Dimethyl-3-oxo-3-phenyl-1-propanaminiumchlorid (**36a**, 353 mg, 1.65 mmol) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (5 mL) suspendiert. Nach Zusatz von Palladium(II)acetat (17 mg, 0.076 mmol) und Triethylamin (2 mL) wurde bei 140 °C Blocktemperatur im Parallelsynthesereaktor gerührt. Sobald dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war, wurde der Reaktionsansatz heiß filtriert. Nach der Heißfiltration wurden jeweils zwei Ansätze der Parallelsynthese vereinigt. Dem Filtrat wurde Kieselgel (1.5 g) zugefügt und die Suspension im Vakuum eingeeengt. Der zurückbleibende Feststoff wurde auf eine 3.5 cm dicke Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgetragen. Unter Einsatz von Vakuum wurde mit Ethylacetat (800 mL) eluiert, welches anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft wurde. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 443 mg (45%) eines hellgelben Pulvers erhalten.

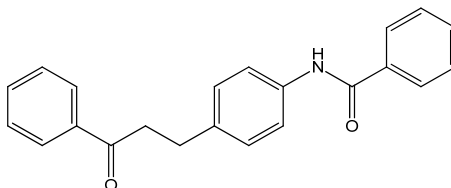
Schmp.: 184-185 °C (Lit.¹²⁴: 187-188 °C)

{4-[(2*E*)-3-(9-*tert*-Butyl-6-oxo-5,6,7,12-tetrahydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-2-yl)prop-2-enoyl]phenoxy}essigsäureethylester (45)



9-*tert*-Butyl-2-[(1*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepin-6(5*H*)-on (**17f**; 451 mg, 1.00 mmol), Bromessigsäureethylester (139 μ L, 1.25 mmol) und Kaliumcarbonat (250 mg, 2.00 mmol) wurden in getrocknetem Aceton (15 mL) solange zum Rückfluss erhitzt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war. Anschließend wurde das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurden 308 mg (57%) eines gelben Pulvers erhalten.

Schmp.: 240-242 °C; IR (KBr): 3435 cm^{-1} (NH), 2957 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1665 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) =: 1.23 (t, 3H, J = 7.15 Hz, CH_3), 1.38 (s, 9H, CH_3), 3.59 (s, 2H, Azepin CH_2), 4.20 (q, 2H, J = 7.15 Hz, CH_2), 4.95 (s, 2H, CH_2), 7.12 - 7.13 (m, 2H, ArH), 7.29 - 7.31 (m, 2H, ArH), 7.41 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.63 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 7.78 (d, 1H, J = 15.4 Hz, Vinyl-H), 7.90 (dd, 1H, J = 1.9/8.5 Hz, ArH), 7.99 (d, 1H, J = 15.4, Vinyl-H), 8.17 - 8.19 (m, 2H, ArH), 8.22 (d, 1H, J = 1.9 Hz, ArH), 10.35 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 14.0 (CH_3), 31.6 (Azepin CH_2), 31.7 (3x CH_3), 60.7 (CH_2), 64.6 (CH_2); 111.0, 113.5, 114.5 (2C), 120.6, 121.3, 122.4, 127.5, 128.0, 130.7 (2C), 142.6 (tert. C); 34.3, 107.6, 123.0, 126.2, 130.0, 131.0, 132.0, 135.7, 136.8, 141.6, 161.4, 168.3, 171.3, 187.1 (quart. C); $\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$ (536.62); MS (EI): m/z (%) = 536 $[\text{M}]^+$ (100); HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ ber. 536.23112; gef. 536.22969; HPLC: 96.2% bei 254 nm und 96.1% bei 280 nm, t_N = 3.05 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O 70:30), λ_{max} : 325 nm.

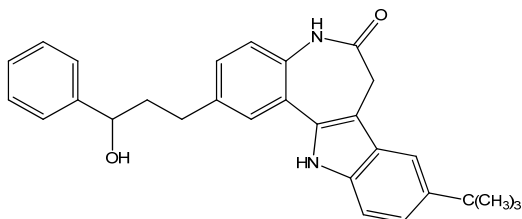
N-[4-(3-Oxo-3-phenylpropyl)phenyl]benzamid (**46**)

N-[4-[(1*E*)-3-Oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]phenyl]benzamid (**44**; 166 mg, 0.507 mmol) und Zinkstaub (325 mg, 5.00 mmol) wurden in Essigsäure (15 mL) im Ultraschallbad beschallt. Nach 10 Minuten wurde der Reaktionsansatz filtriert und der Filterkuchen dreimal mit Ethylacetat (10 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde in Wasser gegossen, mit Natriumhydroxid-Lösung (1 mol/L) auf pH 5-6 eingestellt und mit Ethylacetat (70 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulen-chromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (1:1) als Elutionsmittel gereinigt. Es wurden 13 mg (8%) eines weißen Pulvers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600.1 MHz): δ (ppm) = 2.93 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH_2), 7.25 - 7.27 (m, 2H, ArH), 7.51 - 7.54 (m, 4H, ArH), 7.57 - 7.60 (m, 1H, ArH), 7.62 - 7.65 (m, 1H, ArH), 7.67 - 7.69 (m, 2H, ArH), 7.94 - 7.95 (m, 2H, ArH), 7.99 - 8.00 (m, 2H, ArH), 10.20 (s, 1H, NH); Überlagerung einer CH_2 -Gruppe durch das H_2O -Signal bei 3.37 - 3.39 ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150.9 MHz): δ (ppm) = 28.9 (CH_2), 39.4 (CH_2); 120.3 (2C), 127.5 (2C), 127.9 (2C), 128.3 (2C), 128.4 (2C), 128.6 (2C), 131.4, 136.5 (tert. C); 133.1, 134.9, 136.4, 137.0, 165.3, 199.2 (quart. C); HPLC: 97.4% bei 254 nm und 97.1% bei 280 nm, t_N = 2.62 min, t_M = 1.03 min (ACN/ H_2O 60:40), λ_{max} : 241 nm und 393 nm.

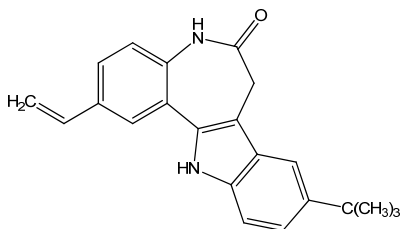
Der Schmelzpunkt der Verbindung **46** wurde nicht bestimmt.

(RS)-9-tert-Butyl-2-(3-hydroxy-3-phenylpropyl)-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6-(5H)-on (47)



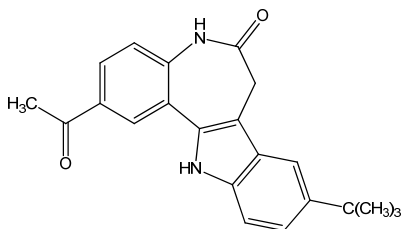
9-*tert*-Butyl-2-[(1*E*)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**17e**; 435 mg, 1.00 mmol) und Magnesium-Späne (972 mg, 40.0 mmol) wurden in Methanol (70 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 h wurde der Reaktionsansatz im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 10%iger Salzsäure gelöst und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Man erhielt 390 mg (89%) eines gelben Pulvers, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

Schmp.: 242-244 °C (Zers.); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.36 (s, 9H, CH₃), 1.95 - 1.99 (m, 2H, CH₂), 2.62 - 2.66 (m, 1H, -CH(OH)-CH₂), 2.72 - 2.76 (m, 1H, -CH(OH)-CH₂), 3.47 (s, 2H, Azepin CH₂), 4.58 - 4.61 (m, 1H, -CH(OH)), 5.33 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz, OH), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, ArH), 7.18 (d, 1H, *J* = 8.3/1.9 Hz, ArH), 7.22 - 7.26 (m, 2H, ArH), 7.32 - 7.38 (m, 5H, ArH), 7.54 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 7.58 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 10.0 (s, 1H, NH), 11.4 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.0, 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 40.8; 71.7, 110.9, 113.3, 120.2, 122.2, 125.7 (2C), 126.1, 126.6, 127.8, 127.9 (2C) (tert. C); 34.3, 107.4, 122.8, 126.2, 132.6, 133.1, 135.5, 137.4, 141.4, 146.1, 171.4 (quart. C). HPLC: 82.8 % bei 254 nm und 84.4 % bei 280 nm, *t*_N = 10.98 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 50:50), λ_{max}: 233 nm, 316 nm und 398 nm. Die Substanz enthält Verunreinigungen: 1.2% bei 254 nm und 1.2% bei 280 nm, *t*_N = 5.31 min; 1.9% bei 254 nm und 2.1% bei 280 nm, *t*_N = 6.73 min; 6.2% bei 254 nm und 5.4% bei 280 nm, *t*_N = 9.97 min; 1.9% bei 254 nm und 2.5% bei 280 nm, *t*_N = 12.18 min; 1.3% bei 254 nm und 0.2% bei 280 nm, *t*_N = 18.14 min und 1.1 % bei 254 nm und 1.0% bei 280 nm, *t*_N = 19.54 min.

9-*tert*-Butyl-2-vinyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (48)

Zu einer Lösung von 9-*tert*-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**27**; 421 mg, 0.978 mmol) in *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) wurden Tributylvinylzinn (588 μ L, 2.00 mmol), Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (70 mg, 0.1 mmol) und sechs Kristalle 2,6-Di-*tert*-Butyl-4-methylphenol hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde 45 min bei 60-70 °C unter Stickstoffbegasung gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz nach Zugabe von Kieselgel (1.5 g) am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (1:1) als Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 15-20 cm gereinigt. Die gewünschten Fraktionen wurden nach Entfernen des Elutionsmittels aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 102 mg (31%) eines gelblichen Pulvers erhalten.

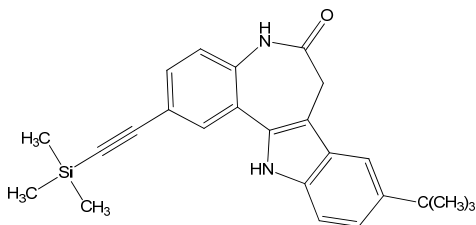
Schmp.: 304-305 °C (Zers.); IR (KBr): 3200 cm^{-1} (NH), 2954 cm^{-1} (CH aliphatisch), 1650 cm^{-1} (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600.1 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 3.52 (s, 2H, Azepin CH₂), 5.31 (dd, 1H, J = 10.8/0.7 Hz, CH=CH₂), 5.90 (dd, 1H, J = 17.5/0.8 Hz, CH=CH₂), 6.79 (dd, 1H, J = 17.7/10.9 Hz, CH=CH₂), 7.21 (d, 1H, J = 8.5 Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, J = 8.5/1.7 Hz, ArH), 7.37 (d, 1H, J = 8.1 Hz, ArH), 7.49 (dd, 1H, J = 8.5/2.1 Hz, ArH), 7.60 (d, 1H, J = 1.7 Hz, ArH), 7.82 (d, 1H, J = 2.1 Hz, ArH), 10.16 (s, 1H, NH), 11.49 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150.9 MHz): δ (ppm) = 31.5 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃), 114.0 (=CH₂); 110.9, 113.4, 120.4, 122.4, 124.5, 125.4, 135.8 (tert. C); 34.3, 107.5, 122.9, 126.1, 132.3, 132.5, 134.8, 135.6, 141.4, 171.4 (quart. C); C₂₂H₂₂N₂O (330.42); ber. C 79.97, H 6.71, N 8.48; gef. C 79.71, H 6.72 N 8.58; HPLC: 98.5% bei 254 nm und 98.8% bei 280 nm, t_N = 6.48 min, t_M = 1.03 min (ACN/H₂O 55:45), λ_{max} : 275 nm, 247 nm und 316 nm.

2-Acetyl-9-*tert*-butyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (49)

9-*tert*-Butyl-2-ethynyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**52**; 181 mg, 0.551 mmol) wurde in 70%igem Aceton (20 mL) gelöst. Nach Zugabe von konzentrierter Schwefelsäure (0.0588 mL, 1.10 mmol) und Quecksilber(II)acetat (176 mg, 0.552 mmol) wurde der Reaktionsansatz refluxiert, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, mit Wasser versetzt (30 mL) und dreimal mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, mit Kieselgel (1.5 g) versetzt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der zurückbleibende Feststoff wurde auf eine 3.5 cm dicke Kieselgelschicht in einer Glasfritte aufgetragen. Unter Einsatz von Vakuum wurde mit Ethylacetat (400 mL) eluiert, welches anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft wurde. Es wurden 109 mg (57%) eines beigen Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

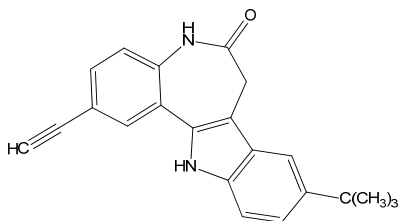
Schmp.: > 360 °C (Zers.); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.0 MHz): δ (ppm) = 1.37 (s, 9H, CH₃), 2.65 (s, 3H, CH₃), 3.58 (s, 2H, Azepin CH₂), 7.30 (dd, 1H, *J* = 8.6/1.8 Hz, ArH), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.62 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, ArH), 7.92 (dd, 1H, *J* = 8.3/2.3 Hz, ArH), 8.36 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH) 10.42 (s, 1H, NH), 11.62 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 150.9 MHz): δ (ppm) = 26.6, 31.6 (Azepin CH₂), 31.7 (3x CH₃); 111.0, 113.5, 126.7, 122.0, 127.3, 127.5, (tert. C); 34.3, 107.8, 122.4, 126.1, 131.7, 131.9, 135.8, 138.9, 141.6, 171.9, 196.6 (quart. C).

9-tert-Butyl-2-[(trimethylsilyl)ethynyl]-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (51)



9-tert-Butyl-2-iod-7,12-dihydroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-on (**27**; 430 mg, 1.00 mmol) wurden mit Bis(triphenylphosphin)palladium(II)dichlorid (14 mg, 0.020 mmol) und Kupfer(I)iodid (7.6 mg, 0.040 mmol) in Triethylamin (5 mL) und *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) bei 50 °C unter Stickstoffbegasung gerührt. Es wurde langsam über einen Tropftrichter Trimethylsilylacetylen (555 µL, 4.00 mmol, nachgespült mit *N,N*-Dimethylformamid (1 mL)) hinzugefügt. Nach einer Stunde bei 50 °C unter Stickstoff wurde der Ansatz mit Aceton (50 mL) versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde nach Zugabe von Kieselgel (1.5 g) im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit einem Gemisch aus Toluol/Cyclohexan (1:1) als Elutionsmittel über eine Säulenlänge von 15-20 cm gereinigt. Die gewünschten Fraktionen wurden nach Entfernen des Elutionsmittels aus Ethanol umkristallisiert. Es wurden 221 mg (55%) hellbraune Kristalle erhalten, die ohne weitere Reinigung umgesetzt wurden.

Schmp.: 297-298 °C; IR (KBr): 3436 cm⁻¹ (NH), 2957 cm⁻¹ (CH aliphatisch), 2155 cm⁻¹ (C≡C-), 1671 cm⁻¹ (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400.4 MHz): δ (ppm) = 0.25 (s, 9H, CH₃ Trimethylsilyl), 1.36 (s, 9H, CH₃), 3.54 (s, 2H, Azepin CH₂), 7.22 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, *J* = 8.8/2.0 Hz, ArH), 7.35 (dd, 1H, *J* = 8.5/0.5 Hz, ArH), 7.43 (dd, 1H, *J* = 8.3/1.8 Hz, ArH), 7.60 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, ArH), 7.84 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, ArH), 10.27 (s, 1H, NH), 11.51 (s, 1H, NH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100.7 MHz): δ (ppm) = 0.1 (3x CH₃ Trimethylsilyl), 31.6 (Azepin CH₂), 31.8 (3x CH₃); 111.1, 113.5, 120.7, 122.4, 130.0, 130.6 (tert. C); 34.4, 93.8, 104.8, 107.9, 117.1, 123.0, 126.2, 131.4, 135.6, 135.8, 141.7, 171.4 (quart. C); C₂₅H₂₈N₂OSi (400.59); HPLC: 99.0% bei 254 nm und 99.1% bei 280 nm, *t*_N = 4.16 min, *t*_M = 1.03 min (ACN/H₂O 75:25), λ_{max}: 279 nm, 232 nm und 318 nm.

9-*tert*-Butyl-2-ethynyl-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (52)

9-*tert*-Butyl-2-[(trimethylsilyl)ethynyl]-7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-on (**51**; 338 mg, 0.844 mmol) wurde in Tetrahydrofuran (5 mL) gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (1.27 g, 4.03 mmol) in Tetrahydrofuran (5 mL) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur unter Stickstoffbegasung 20 min gerührt. Anschließend wurde die Mischung mit gesättigter Kochsalzlösung (30 mL) versetzt und dreimal mit Ethylacetat (30 mL) extrahiert. Die Ethylacetatphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Es wurden 257 mg (93%) eines beigen Pulvers erhalten, das ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

Schmp.: > 360 °C (Zers.); $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400.0 MHz): δ (ppm) = 1.36 (s, 9H, CH_3), 3.54 (s, 2H, Azepin CH_2), 4.21 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 7.23 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.28 (dd, 1H, $J = 8.6/1.8$ Hz, ArH), 7.36 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, ArH), 7.45 (dd, 1H, $J = 8.3/1.8$ Hz, ArH), 7.60 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, ArH), 7.86 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 10.25 (s, 1H, NH), 11.50 (s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100.6 MHz): δ (ppm) = 31.6 (Azepin CH_2), 31.7 (3x CH_3); 80.4 (C Ethynyl), 83.1 (C Ethynyl); 111.1, 113.5, 120.7, 122.4, 130.1, 130.7 (tert. C); 34.3, 108.0, 116.7, 123.1, 126.2, 131.4, 135.5, 135.8, 141.7, 171.4 (quart. C).

Anhang zu Abschnitt 7.2: Gefahrstoffverzeichnis

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Gefahrstoffe müssen unter Beachtung der einschlägigen Gefahren- und Sicherheitshinweise (H- und P-Hinweise, *hazard and precautionary statements*) gehandhabt werden. Bei den im Folgenden aufgeführten Chemikalien sind besondere Gefahren zu beachten.

Die Kennzeichnung und Einstufung der Substanzen richtet sich nach der CLP-Verordnung (Regulation on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung, und Verpackung von Stoffen und Gemischen), die am 20. Januar 2009 in Kraft getreten ist.

4-Acryloylmorpholin

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS07, GHS08

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H318: Verursacht schwere Augenschäden. H373: Kann Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition durch Verschlucken.

Sicherheitshinweise: P260: Staub oder Nebel nicht einatmen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+ P310: Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P302+P350: Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P314: Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Acrylsäurechlorid

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS06, GHS09

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H330: Lebensgefahr beim Einatmen. H302+H312: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H400: Sehr giftig für Wasserorganismen. EUH014: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter Spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Anilin

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS06, GHS08, GHS09

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H301: Giftig beim Verschlucken. H311: Giftig beim Hautkontakt. H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H318: Verursacht schwere Augenschäden. H331: Giftig beim Einatmen. H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen. H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen. H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition. H400: Sehr giftig für Wasserorganismen.

Sicherheitshinweise: P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Benzylamin

Gefahrenpiktogramme: GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H302+H312: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder

Hautkontakt. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter Spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Dichlormethan

Gefahrenpiktogramme: GHS08

Signalwort: Achtung

Gefahrenhinweise: H351: Kann vermutlich Krebs erzeugen.

Sicherheitshinweise: P260: Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden. P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

N,N-Dimethylformamid

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07, GHS08

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar. H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. H360D: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P301+P310: Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P304+P340: Bei Einatmen: an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Kaliumhydrid

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H260: In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. EUH014: Reagiert heftig mit Wasser.

Sicherheitshinweise: P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter Spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P402+P404: In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren. P301+P310: Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Methanol

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS06, GHS08

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H301: Giftig bei Verschlucken. H311: Giftig bei Hautkontakt. H331: Giftig bei Einatmen. H370: Schädigt die Organe.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P304+P340: Bei Einatmen: an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P310: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt rufen.

1-Methylpiperazin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar. H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. H314: Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze schützen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Piperidin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS06

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H311: Giftig beim Hautkontakt. H331: Giftig beim Einatmen. H314: Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P309+P310: Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Pyrrolidin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H314: Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden. H332: Gesundheitsschädlich beim Einatmen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P280: Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P301+P330+P331: Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen. P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. H310: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

Tetrahydrofuran

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS07

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225+EUH019: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Kann explosionsfähige Peroxide bilden. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H335: Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: P210: Vor Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P233: Behälter dicht verschlossen halten. P243: Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Tributylvinylzinn

Gefahrenpiktogramme: GHS06, GHS08, GHS09

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H301: Giftig bei Verschlucken, H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt. H315: Verursacht Hautreizungen. H319: Verursacht schwere Augenreizung. H372: Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.

Sicherheitshinweise: P260: Staub oder Nebel nicht einatmen. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe /Schutzkleidung/ Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

Triethylamin

Gefahrenpiktogramme: GHS02, GHS05, GHS06

Signalwort: Gefahr

Gefahrenhinweise: H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. H311: Giftig bei Hautkontakt. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen. H335: Kann die Atemwege reizen.

Sicherheitshinweise: P210: Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. P302+P350: Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen. P304+P340: Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P308+P313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

7.3 Biologische Daten

Die biologischen Untersuchungen wurden von Frau Ma'ayan Papini¹⁰⁷ und Herrn Abdelmajeed Nasereddin aus dem Arbeitskreis von Prof. Charles L. Jaffe an der Hebrew University of Jerusalem durchgeführt.

7.3.1 Zellkulturen

Axenische Amastigoten (Zelllinie *Leishmania donovani* (MJOM/SD/62/1S-CL2D)) wurden in einem supplementierten RPMI-1640-Medium (pH 5.5), welches 20% fetales Kälberserum enthält, bei 37 °C in einem Brutschrank mit einem Kohlendioxid-Anteil von 5% nach der von Debrabant et al. beschriebenen Methode generiert.¹²⁵

Trypanosoma brucei rhodesiense (STIB 900 (S704) Tanzania) Trypomastigoten (Blutform) wurden in HMI-11-Medium bei 37 °C in einem Brutschrank mit einem Kohlendioxid-Anteil von 5% in 24-Well Flat-bottom-Mikrotiterplatten kultiviert.¹²⁶

Die humane monozytische Leukämie Zell-Linie (THP-1 Zellen) wurde in RPMI-1640-Medium mit Penicillin G (100 IU), Streptomycin (100 µg/ml), 2 mM L-Glutamin und 10% (V/V) fetalem Kälberserum in einem Brutschrank (37 °C mit einem Kohlendioxid-Anteil von 5%) kultiviert.⁷¹

7.3.2 Bestimmung der Wachstumshemmung von axenischen Amastigoten

Leishmanien, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden mit Amastigoten-Medium zu 6.25×10^4 Zellen/Kavität verdünnt.¹⁰⁸

Amastigoten (125 µL/Kavität) wurden in jeweils drei Kavitäten einer 96-Well Flat-bottom-Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert, die die zu testende Substanz in Amastigoten-Medium (125 µL/Kavität, finale DMSO-Konzentration: 0.15%) enthielt. Die Testsubstanzen wurden in einer Konzentration von 15 µM verwendet. Als Negativkontrolle wurden jeweils Proben mit Amastigoten in Medium bzw. in Medium mit 0.15% DMSO vermessen. Positivkontrollen wurden mit Parasiten in Medium, das 1 µM Amphotericin B enthielt, durchgeführt. Das Medium allein wurde zur Ermittlung des Blank-Wertes verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37 °C und 5% CO₂-Anteil im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden jeweils 25 µL AlamarBlue®-Viabilitätsindikator (AbD Serotec, Oxford, UK) zugefügt und die Mikrotiterplatte wurde für weitere 24 Stunden unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 544$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) der Proben

wurde mit einem Microplate Reader (Flouroskan Ascent FL, Finnland) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 4 (GraphPad software).

7.3.3 Bestimmung der Wachstumshemmung von Trypomastigoten (Blutform)

Sich aktiv teilende Trypomastigoten wurden zu 4×10^3 Parasiten/mL mit HMI-11-Medium verdünnt. Trypomastigoten (4×10^3 Zellen/mL; 50 μ L) wurden jeweils in drei Kavitäten einer 96-Well Flat-bottom-Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert, die 50 μ L der zu testenden Verbindung in Medium enthielt. Es wurden zwei Konzentrationen der Testsubstanzen verwendet: 5 μ M und 15 μ M. Die äußeren Vertiefungen wurden mit bidestilliertem Wasser gefüllt (100 μ L/Kavität), um Artefakte, die durch das Verdunsten des Mediums entstehen könnten, auszuschließen. Als Negativkontrolle wurden jeweils Proben mit Trypomastigoten in Medium bzw. in Medium mit 0.15% DMSO vermessen. Positivkontrollen wurden mit Parasiten in Medium, die 6.5 μ M DFMO (DL- α -Difluormethylornithinhydrochlorid-Hydrat) enthielten, durchgeführt. Nach Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37 °C und 5% CO₂-Anteil für 70 Stunden wurden jeweils 10 μ L AlamarBlue®-Viabilitätsindikator (AbD Serotec, Oxford, UK) zugefügt und die Mikrotiterplatte wurde für weitere 2 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenz (λ_{ex} = 544 nm und λ_{em} = 590 nm) der Proben wurde mit einem Microplate Reader (Flouroskan Ascent FL, Finnland) vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 4 (GraphPad software).

7.3.4 Bestimmung der GI₅₀-Werte

Für Verbindungen, die im Trypomastigoten-Assay eine gute biologische Aktivität zeigten, wurden anschließend die GI₅₀-Werte bestimmt. Im Trypomastigoten-Assay wurden Konzentrationen von 0.007 - 15 μ M verwendet. Die Durchführung und Auswertung der Assays erfolgte wie unter 7.3.3 beschrieben.

7.3.5 Assay zur Bestimmung der Toxizität gegenüber humanen Zellen (THP-1-Zellen)

THP-1-Zellen (8×10^5 Zellen/mL; 125 μ L) wurden jeweils in drei Kavitäten einer 96-Well Flat-bottom-Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) pipettiert, die die zu testende Substanz in Medium (125 μ L/Kavität, finale DMSO-Konzentration: 0.15%) enthielt. Zur Bestimmung der Toxizität wurde die Substanzkonzentration von 5 μ M getestet. Als Negativkontrolle wurden jeweils Proben mit THP-1-Zellen in Medium

bzw. in Medium mit 0.15% DMSO vermessen. Nach der Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂-Anteil für 48 Stunden, wurde 25 µL AlamarBlue®-Viabilitätsindikator (AbD Serotec, Oxford, UK) zugefügt und die Mikrotiterplatte wurde für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie unter 7.3.2 beschrieben.

7.3.6 Identifizierung leishmanieller Proteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie

Das Paullon-Chalkon-Hybrid **20** wurde an einer quervernetzten Diaminodipropylamin-derivatisierten Agarose (CarboxyLink™ immobilization kit, Pierce Biotechnology, Thermo Scientific) gemäß der Herstellervorschrift immobilisiert.

L. donovani-Promastigoten der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($1-5 \times 10^8$ Zellen) wurden durch Zentrifugation geerntet, mit phosphatgepufferter Salzlösung (NaCl: 200g/L, Na₂HPO₄: 27 g/L, KH₂PO₄: 58 g/L, pH 7.4) gewaschen und einem tensidhaltigem Solubilisationspuffer (0.5% NP-40, 0.1% Protease Inhibitor Cocktail mit EDTA (Sigma Aldrich, Katalognr. S8820), 20 mM TRIS-Puffer, ~ 600 µL) suspendiert und 30 min lang im Eisbad gekühlt. Anschließend wurde das nicht solubilisierter Material durch Zentrifugation entfernt ($14500 \times g$, 30', 4 °C) und der Überstand (~ 300 µL) wurde über Nacht bei 4 °C mit der vorbereiteten Paullon-Chalkon-Matrix (50 µL) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Überstand mit nicht immobilisierter Matrix inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Matrix auszuschließen. Nach der Inkubation wurde die Matrix dreimal gewaschen (0.1% NP-40 in TBS (NaCl: 8 g/L, KCl: 0.2 g/L, TRIS Base: 3 g/L, pH 7.4), 20 mM, 1 mL). Das gebundene Material wurde eluiert, indem die Matrix mit SDS-PAGE Probenpuffer für 2-3 Minuten gekocht wurde. Mit Hilfe der Gelelektrophorese (12%iges Acrylamid Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel bei 120 V/m) wurde das eluierte Material getrennt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Silberfärbung.¹²⁷

8. Literaturverzeichnis

- [1] *Global plan to combat neglected tropical diseases 2008–2015*, **2007**, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] WHO:World Health Organization,
http://www.who.int/gho/neglected_diseases/en/index.html, abgerufen am 10.02.2012.
- [3] *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases*, **2010**, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [4] Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M.: *Medizinische Mikrobiologie*, 10. Aufl., **2001**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 510-516.
- [5] *Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010*, **2010**, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [6] Mishra, J., Saxena, A., Singh, S.: Chemotherapy of leishmaniasis: Past, present, future. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 1153-1169.
- [7] Santos, D. O., Coutinho, C. R. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., Bernardino, A., Bourguignon, S. C., Corte-Real, S., Pinho, R. T., Rodrigues, C. R., Castro, H. C. : Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* **2008**, 103, 1-10.
- [8] Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H.: Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19, 111-126.
- [9] Nagill, R., Kaur, S.: Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, 11, 1464-1488.
- [10] Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., Boelaert, M.: Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, 5, 873-882.
- [11] Frézard, F., Martins, P. S., Barbosa, M. C. M., Pimenta, A. M. C., Ferreira, W. A. , de Melo, J. E., Mangrum, J. B.: New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 656-665.
- [12] Roberts, W., McMurray, W. J., Rainey, P. M.: Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (Glucantime). *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 1076-1082.

- [13] Berman, J. D., Gallalee, J. V., Best, J. M.: Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 197-201.
- [14] Sereno, D., Holzmüller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaisi, A., Lemesre, J.-P.: Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 2064-2069.
- [15] Colotti, G., Ilari, A.: Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids* **2011**, 40, 269-385.
- [16] Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., Ilari, A.: Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2603-2612.
- [17] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H. J.: *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe*, 1. Aufl., **2005**, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 564-565.
- [18] Dupont, B.: Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, Suppl. S1, 31-36.
- [19] Ryczak, J., Kunick, C.: Wirkstoffe zur Behandlung von Leishmaniosen. Antimon und mehr. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 538-544.
- [20] Ouellette, M., Drummelsmith, J., Leprohon, P., El Fadili, K., Foucher, A., Vergnes, B., Légaré, D.: *Drug resistance in Leishmania*. In: "*Leishmania after the Genome*", Myler, P.J., Fasl, N. (Hrsg.), **2008**, Caister Academic Press, Norfolk, UK 159-176.
- [21] Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A., Robert-Gero, M.: Mechanism of Amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 352-357.
- [22] Croft, S. L., Engel, J.: Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, 100, S4-S8.
- [23] Bhattacharya, S. K., Sinha, P. K., Sundar S., Thakur, C. P., Jha, T. K., Pandey, K., Das, V. R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V. P., Ranjan, A., Verma, R. B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N. K.: Phase 4 trial of Miltefosine for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **2007**, 196, 591-598.
- [24] Luque-Ortega, J. R., Rivas, L.: Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 1327-1332.
- [25] Sindermann, H., Croft, S. L., Engel, K. R., Bommer, W., Eibl, H. J., Unger, C., Engel, J.: Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* **2004**, 193, 173-180.

- [26] Sundar, S., Murray, H. W.: Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull. W. H. O.* **2005**, 83, 394-395.
- [27] Perez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M., Castanys, S.: Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 49965-49971.
- [28] Perez-Victoria, J. M., Di Pietro, A., Barron, D., Ravelo, A. G., Castanys, S., Gamarro, F.: Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr. Drug Targets* **2002**, 3, 311-333.
- [29] Nguewaa, P. A., Fuertes, M. A., Cepedab, V., Iborrab, S., Carrión, J., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J. M.: Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. *Chem. Biodiversity* **2005**, 2, 1387-1400.
- [30] Vercesi, A., Docampo, R.: Ca^{2+} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem. J.* **1992**, 284, 463-467.
- [31] Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Sinha, P. K., Bhattacharya, S. K.: Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 356, 2571-2581.
- [32] Sundar, S., Chakravarty, J.: Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin. Invest. Drugs* **2008**, 17, 787-794.
- [33] Maarouf, M., Lawrence, F., Brown, S., Robert-Gero, M.: Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasitol. Res.* **1997**, 83, 198-202.
- [34] Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P. X., Robert-Gero, M.: *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell Res.* **1997**, 232, 339-348.
- [35] Maarouf, M., Lawrence, F., Croft, S. L., Robert-Gero, M.: Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol. Res.* **1995**, 81, 421-425.
- [36] Maarouf, M., Adeline, M. T., Solignac, M., Vautrin, D., Robert-Gero, M.: Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* **1998**, 5, 167-173.
- [37] Wasunna, M. K., Rashid, J. R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J. M., Sabin, A. J., Horton, J.: A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 871-876.

- [38] Croft, S. L., Olliaro, P.: Leishmaniasis chemotherapy - challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, 17, 1478-1483.
- [39] Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P., Modabber, F.: Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* **2011**, 377, 477-486.
- [40] Chan-Bacab, M. J., Peña-Rodríguez, L. M.: Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 674-688.
- [41] Seifert, K.: Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med. Chem. J.* **2011**, 5, 31-39.
- [42] Date, A. A., Joshi, M. D., Patravale, V. B.: Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59, 505-521.
- [43] Stich, A., Steverding, D.: Die Rückkehr einer Seuche. *Biol. unserer Zeit* **2002**, 32, 294-302.
- [44] WHO: World Health Organization, http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/, abgerufen am 10.02.2012.
- [45] Stich, A.: Die Afrikanische Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 546-550.
- [46] Malvy, D., Chappuis, F.: Sleeping sickness. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, 17, 986-995.
- [47] Burri, C.: Chemotherapy against human African trypanosomiasis: Is there a road to success? *Parasitology* **2010**, 137, 1987-1994.
- [48] Schlitzer, M.: Wirkstoffe zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit. *Pharm. Unserer Zeit* **2009**, 38, 552-558.
- [49] Pal, A., Hall, B. S., Field, M. C.: Evidence for a non-LDL-mediated entry route for the trypanocidal drug suramin in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 122, 217-221.
- [50] Delespaulx, V., de Koning, H. P.: Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drugs Resist. Updates* **2007**, 10, 30-50.
- [51] Steverding, D.: The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasit. Vectors* **2010**, 3, 15.
- [52] Nok, A. J.: Effective measures for controlling trypanosomiasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, 6, 2645-2653.

- [53] Krauth-Siegel, R. L., Bauer, H., Schirmer, R. H.: Dithiolproteine als Hüter des intrazellulären Redoxmilieus bei Parasiten: alte und neue Wirkstoff-Targets bei Trypanosomiasis und Malaria. *Angew. Chem.* **2005**, 117, 698-724.
- [54] Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C.: Human african trypanosomiasis. *Lancet* **2010**, 375, 148-159.
- [55] Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R., Tidwell, R. R.: Human african trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, 152, 1155-1171.
- [56] Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohl, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E., Kande, V.: Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* **2009**, 374, 56-64.
- [57] Hall, B. S., Bot, C., Wilkinson, S. R.: Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 13088-13095.
- [58] Jacobs, R. T., Nare, B., Phillips, M. A.: State of the art in African trypanosome drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 1255-1274.
- [59] Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M. A., Pécoul, B.: Fexinidazole – A new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, 4, e923.
- [60] DNDI: Drugs for Neglected Disease *initiative*, <http://www.dndi.org/portfolio/fexinidazole.html>, abgerufen am 10.02.2012.
- [61] Jacobs, R. T., Nare, B., Wring, S. A., Orr, M. D., Chen, D., Sligar, J. M., Jenks, M. X., Noe, R. A., Bowling, T. S., Mercer, L. T., Rewerts, C., Gaukel, E., Owens, J., Parham, R., Randolph, R., Beaudet, B., Bacchi, C. J., Yarett, N., Plattner, J. J., Freund, Y., Ding, C., Akama, T., Zhang, Y. K., Brun, R., Kaiser, M., Scandale, I., Don, R.: SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 human African trypanosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, 5, e1151.
- [62] Knockaert, M., Wieking, K., Schmitt, S., Leost, M., Grant, K. M., Mottram, J. C., Kunick, C., Meijer, L.: Intracellular targets of Paullones. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25493-25501.
- [63] Meijer, L., Leost, M., Lozach, O., Schmitt, S., Kunick, C.: *The paullones: A family of pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Pinna, L. A., Cohen, P. W. (Hrsg.), 2005, Springer Verlag 47-64.*

- [64] Grant, K. M., Hassan, P., Anderson, J. S., Mottram, J. C.: The crk3 gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated cdc2-related histone H1 kinase that associates with p12^{cks1}. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10153-10159.
- [65] Mottram, J. C., Kinnaird, J. H., Shield, B. R., Taitn, A., Barry, J. D.: A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21044-21051.
- [66] Chawla, B., Madhubala, R.: Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.* **2010**, 34, 1-13.
- [67] Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K., Mottram, J. C.: The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Biochem. Parasitol.* **2001**, 113, 189-198.
- [68] Grant, K. M., Dunion, M. H., Yardley, V., Skaltsounis, A.-L., Marko, D., Eisenbrand, G., Croft, S. L., Meijer, L., Mottram, J. C.: Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: Chemical library screen and antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 3033-3042.
- [69] Reichwald, C.: Eine neue Variante der Heck-Reaktion zur Darstellung antileishmanieller Paullone. Dissertation Universität Braunschweig, **2008**.
- [70] Nowakowska, Z.: A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 125-137.
- [71] Reichwald, C., Shimony, O., Dunkel, U., Sacerdoti-Sierra, N., Jaffe, C. L., Kunick, C.: 2-(3-Aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-*tert*-butyl-paullones: A new antileishmanial chemotype. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 659-665.
- [72] Souza, A. M., Castro, H. C., Brito, M. A., Andrighetti-Fröhner, C. R., Magalhães, U., Oliveira, K. N., Gaspar-Silva, D., Pacheco, L. K., Joussef, A. C., Steindel, M., Simões, C. M., Santos, D. O., Albuquerque, M. G., Rodrigues, C. R., Nunes, R. J.: *Leishmania amazonensis* growth inhibitors: Biological and theoretical features of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives. *Curr. Microbiol.* **2009**, 59, 374-379.
- [73] Aponte, J. C., Castillo, D., Estevez, Y., Gonzalez, G., Arevalo, J., Hammond, G.B., Sauvain, M.: In vitro and in vivo *anti-Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 100-103.
- [74] Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A. T., Corrêa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E. C., Assreuy, J., Calixto, J. B., Santos, A. R.: Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 1449-1451.

- [75] Bello, M. L., Chiaradia, L. D., Dias, L. R., Pacheco, L. K., Stumpf, T. R., Mascarello, A., Steindel, M., Yunes, R. A., Castro, H. C., Nunes, R. J., Rodrigues, C. R.: Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure-activity relationship (SAR). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5046-5052.
- [76] Richard, J. V., Werbovets, K. A.: New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 447-455.
- [77] Mottram, J. C.: cdc2-related protein kinases and cell cycle control in trypanosomatids. *Parasitol. Today* **1994**, 10, 253-257.
- [78] Naula, C., Parsons, M., Mottram, J. C.: Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1754, 151-159.
- [79] Ojo, K. K., Gillespie, J. R., Riechers, A. J., Napuli, A. J., Verlinde, C. L., Buckner, F. S., Gelb, M. H., Domostoj, M. M., Wells, S. J., Scheer, A., Wells, T. N., Van Voorhis, W. C.: Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for African trypanosomiasis therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 3710-3717.
- [80] Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R.: Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 1301-1310.
- [81] Kunick, C., Schultz, C., Lemcke, T., Zaharevitz, D. W., Gussio, R., Jalluri, R. K., Sausville, E. A., Leost, M., Meijer, L.: 2-Substituted paullones: CDK1/Cyclin B-inhibiting property and in vitro antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 567-569.
- [82] Xie, X., Lemcke, T., Gussio, R., Zaharevitz, D. W., Leost, M., Meijer, L., Kunick, C.: Epoxide-containing side chains enhance antiproliferative activity of paullones. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 655-661.
- [83] Kunick, C.: Synthese [b]-kondensierter Azepindione durch Dealkoxycarbonylierung. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1991**, 324, 579-581.
- [84] Kunick, C.: Synthese von 7,12-Dihydro-indolo[3,2-d][1]benzazepin-6-(5*H*)-onen und 6,11-Dihydro-thieno-[3',2':2,3]azepino[4,5-*b*]indol-5-(4*H*)-on. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 297-299.
- [85] Heck, R. F., Nolley, J. P.: Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2320-2322.
- [86] Eriksson, J., Åberg, O., Långström, B.: Synthesis of [¹¹C]/[¹³C]acrylamides by palladium-mediated carbonylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 455-461.

- [87] Le Sann, C., Huddleston, J., Mann, J.: Synthesis and preliminary evaluation of novel analogues of quindolines as potential stabilisers of telomeric G-quadruplex DNA. *Tetrahedron* **2007**, 63, 12903-12911.
- [88] Kuhnert, N., Le-Gresley, A.: Synthesis and capsule formation of upper rim substituted tetra-acrylamido calix[4]arenes. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2175-2182.
- [89] Agüero, L., Guerrero-Ramírez, L. G., Katime, I.: New family of functionalized monomers based on amines: A novel synthesis that exploits the nucleophilic substitution reaction. *Mater. Sci. Appl.* **2010**, 1, 103-108.
- [90] Björnstedt, R., Zhong, G., Lerner, R. A., Barbas, C. F.: Copying nature's mechanism for the decarboxylation of β -keto acids into catalytic antibodies by reactive immunization. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11720-11724.
- [91] Lévai, A., Jekő, J.: Synthesis of carboxylic acid derivatives of 2-pyrazolines. *ARKIVOC* **2007**, 134-145.
- [92] Theodorou, V., Skobridis, K., Tzakos, A. G., Ragoussis, V.: A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8230-8233.
- [93] Khurana, J. M., Sharma, P.: Chemoselective reduction of α,β -unsaturated aldehydes, ketones, carboxylic acids, and esters with nickel boride in methanol-water. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, 77, 549-552.
- [94] Saikia, A., Barthakur M. G., Boruah, R. C.: Efficient role of Mg-ZnCl₂ for selective reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds in aqueous medium. *Synlett* **2005**, 523-525.
- [95] Zhang, L., Zhang, W., Wang, X., Bao, K., Lu, G., Lin, J.: Ultrasound assisted selective reduction of chalcones to dihydrochalcones by Zn/HOAc. *Lett. Org. Chem.* **2008**, 5, 370-373.
- [96] Schultz, C.: Antitumoraktive [d]-anellierte [1]Benzazepin-2-one. Dissertation Universität Hamburg, **1999**.
- [97] Hunter, A. C., Priest, S.-M.: An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 β -ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids* **2006**, 71, 30-33.
- [98] Bowden, K., Heilbron, I. M., Jones, E. R. H., Weedon, B. C. L.: 13. Researches on acetylenic compounds. Part I. The preparation of acetylenic ketones by oxidation of acetylenic carbinols and glycols. *J. Chem. Soc.* **1946**, 39-45.
- [99] Kunick, C., Lauenroth, K., Wieking, K., Xie, X., Schultz, C., Gussio, R., Zaharevitz, D., Loest, M., Meyer, L., Weber, A., Jørgensen, F. S., Lemcke, T.: Evaluation and comparison of 3D-QSAR CoMSIA models for CDK1, CDK5, and GSK-3 inhibition by paullones. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 22-36.

- [100] Berger, B. M.: Inhibitoren tumorrelevanter Proteinkinasen auf der Basis von 7-Acetyl-1,3,4,5-tetrahydro-2H-1-benzazepin-2-on: Synthese und biologische Aktivität. Dissertation Universität Braunschweig, **2007**.
- [101] Espinet, P., Echavarren, A. M.: Die Mechanismen der Stille-Reaktion. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4808-4839.
- [102] Cacchi, S., Fabrizi, G., Gavazza, F., Goggiamani, A.: Palladium-catalyzed reaction of aryl iodides with acetic anhydride. A carbon monoxide-free synthesis of acetophenones. *Org. Lett.* **2003**, 5, 289-291.
- [103] Dunkel, U.: Die Sonogashira-Reaktion zur Synthese von alkinylierten 1-Benzazepin-2-onen - Darstellung und biologische Aktivität neuer Kinase-Inhibitoren. Dissertation Universität Braunschweig, **2007**.
- [104] Sagitullina, G. P., Vorontsova, M. A., Garkushenko, A. K., Poendaev, N. V., Sagitullin, R. S.: Nitropyridines: Palladium-catalyzed cross-coupling of 2-bromo-5-nitropyridine with terminal acetylenes. *Russ. J. Org. Chem.* **2009**, 46, 1830-1834.
- [105] Hintermann, L., Labonne, A.: Catalytic hydration of alkynes and its application in synthesis. *Synthesis* **2007**, 1121-1150.
- [106] Claisen, L. u. A. C.: Condensationen von Ketonen mit Aldehyden. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1881**, 14, 2460-2468.
- [107] Papini, M.: Mechanism of action of trypanosomatid inhibitors. Master of Sciences Thesis, Hebrew University Jerusalem, **2012**.
- [108] Shimony, O., Jaffe, C. L.: Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania amastigotes*. *J. Microbiol. Methods* **2008**, 75, 196-200.
- [109] Chang, K. P., Chaudhuri, G., Fong, D.: Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, 44, 499-529.
- [110] Sereno, D., Lemesre, J. L.: Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 972-976.
- [111] Gupta, N., Goyal, N., Rastogi, A. K.: In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends Parasitol.* **2001**, 17, 150-153.
- [112] Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K.: Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* **1980**, 26, 171-176.
- [113] Chen, Q., Ross, A. C.: Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp. Cell Res.* **2004**, 297, 68-81.

- [114] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. : Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 46, 3-26.
- [115] Lipinski, C. A.: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, 1, 337-341.
- [116] Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P.: Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3714-3717.
- [117] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W. , Kopple, K. D.: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2615-2623.
- [118] Molinspiration Cheminformatics,
<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, abgerufen am 02.05.2012.
- [119] Hünig, S., Kreitmeier, P., Märkl, G., Sauer, J.: *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie: Mit Einführungsprogramm*, 2. überarbeitete Neuauflage, **2007**, Lehmanns Media GmbH, Berlin.
- [120] Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L.: *Purification of laboratory chemicals*, 5. Aufl., **2003**, MPG Books, Bodmin, Cornwall, USA, 6-52.
- [121] Parris, C. L., Christenson, R. M.: The amidomethylation of aromatic compounds. *J. Org. Chem.* **1960**, 25, 1888-1893.
- [122] Tamaddon, F., Khoobi, M., Keshavarz, E.: (P₂O₅/SiO₂): a useful heterogeneous alternative for the Ritter reaction. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 38, 3643-3646.
- [123] Chattaway, F. D., Constable, A. B.: XVII. - Derivatives of p-iodoaniline. *J. Chem. Soc.* **1914**, 105, 124 -131.
- [124] Pfeiffer, P.: Die Halochromie aromatischer Aminoketone. *Liebigs Ann. Chem.* **1925**, 441, 228-265.
- [125] Debrabant, A., Joshi, M. B., Pimenta, P. F. P., Dwyer, D. M.: Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: Their growth and biological characteristics. *Int. J. Parasitol.* **2004**, 34, 205-217.
- [126] Hirumi, H., Hirumi, K.: Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. *Parasitol. Today* **1994**, 10, 80-84.
- [127] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.: Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 850-858.

Danksagung

Für die Durchführung der biologischen Testungen an *Leishmania donovani* und an *Trypanosoma brucei rhodesiense* möchte ich mich bei Prof. Dr. C. L. Jaffe von der Hebrew University of Jerusalem in Israel und seinen Mitarbeitern Frau Ma'ayan Papini und Herrn Abedelmajeed Nasereddin bedanken.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. Lutz Preu, Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, für die fachliche Unterstützung im Allgemeinen und insbesondere bei der Auswertung von NMR-Spektren aussprechen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. L. Ernst, Frau Dr. K. Ibrom und Frau P. Holba-Schulz, NMR-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie Dr. U. Papke, Frau D. Döring und Frau C. Mlynek, Massenspektrometrie-Laboratorien der Chemischen Institute der TU Braunschweig, für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Den Mitarbeiterinnen der Analytischen Abteilung des Instituts für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, Frau B. Babic, Frau S. Meyer und Frau P. Reich, gilt mein Dank für die Anfertigung der FT-IR-Spektren und der Elementaranalysen sowie die Probenvorbereitung für die NMR-Experimente. Den Mitarbeitern Herrn K. Hartmann, Herrn E. Hinz, Herrn F. Roese und Herrn M. Söchtig danke ich für die Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten und ihre technische Unterstützung.

Meinen wissenschaftlichen Hilfskräften Frau A. Walter und Frau L. Schlütke sei für die unterstützende Tätigkeit in meinem Labor gedankt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Chemie für die schöne Zeit und die angenehme, kollegiale Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere danke ich den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meines Arbeitskreises Frau Dr. C. Reichwald, Frau Dr. A.-M. Egert-Schmidt, Frau Dr. A. Becker, Frau Dr. W. Fugel, Frau Dr. S. Schmidt, Frau Dr. N. Tolle, Frau R. Determann, Herrn H. Falke, Frau A. Lader, Frau R. Korn, Frau F. Maiwald, Herrn S. Wölfel und Frau A. Walter. Zudem möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei Herrn Dr. L. Preu und den Kollegen des 8. Semesters Frau Dr. S. Schmidt, Herrn F. Kölling, Frau S. Redweik, Frau J. Schur, Frau A. Walter, Frau M. Isedor und Frau S. Lucka für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit im Praktikum

„Arzneimittelanalytik (Drug Monitoring, toxikologische und umweltrelevante Untersuchungen)“ bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. L. Preu für die Hilfe beim Lesen der Korrekturen.

Bei meinem Lebensgefährten Michi möchte ich mich für die stetige Unterstützung und Motivation bedanken.

Lebenslauf

Name	Jasmin Ryczak
Geboren am	08. November 1980
Geburtsort	Kassel
1991 - 2000	Albert-Schweitzer-Schule, Kassel
06/2000	Allgemeine deutsche Hochschulreife
08/2000-06/2002	Ausbildung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin an der Lehranstalt für PTA in Kassel
09/2002-02/2003	Praktische Ausbildung in der Sophien-Apotheke, Kassel
04/2003-02/2007	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
05/2007-04/2008	Praktische Ausbildung zur Apothekerin in der Apotheke am Botanischen Garten, Braunschweig
seit 06/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Carolo- Wilhelmina zu Braunschweig, Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. C. Kunick